

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**Análisis genético de la vía Erk-Mapk en el desarrollo y
mantenimiento de tumores de pulmón promovidos por K-Ras^{G12V}**

TESIS DOCTORAL

Rafael B. Blasco Patiño

Madrid, 2011

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Análisis genético de la vía Erk-Mapk en el desarrollo y
mantenimiento de tumores de pulmón promovidos por K-Ras^{G12V}**

Rafael B. Blasco Patiño

Licenciado en Biología

Director: Dr. Mariano Barbacid Montalbán

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, 2011

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TESIS

El doctorando Rafael Birilo Blasco Patiño ha realizado su trabajo de Tesis Doctoral en el laboratorio de Oncología Experimental del Programa de Oncología Molecular en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), desde Octubre de 2006 hasta Abril de 2011. Dicha tesis se ha realizado bajo la dirección del Dr. Mariano Barbacid Montalbán y la tutoría del Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán.

DIRECTOR

Dr. Mariano Barbacid Montalbán

Investigador Principal de Oncología Experimental (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas)

TUTOR

Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán

Profesor honorario de la Universidad Autónoma de Madrid

Profesor de Investigación del CSIC, Instituto de Investigaciones Biomédicas

A la memoria de mi padre...

...a mi Madre, Felipe y Pedro J

i. Resumen /Summary

i.i RESUMEN

Hemos estudiado el papel de cada miembro de la cascada Raf/Mek/Erk en la iniciación de tumores de pulmón de células no pequeñas, inducidos por la expresión de una forma oncogénica de K-Ras. La eliminación de Erk1 o Erk2, en células que expresaban esta forma oncogénica de K-Ras, no afectaba a la iniciación tumoral debido a la compensación entre ambas isoformas. Sin embargo, la eliminación de ambas quinasas Erk impedía completamente el desarrollo de estos tumores. Similares resultados se obtuvieron para las quinasas Mek. Por otro lado, no se observó compensación entre las quinasas Raf. Mientras que la eliminación de B-Raf no tenía consecuencias en el desarrollo de los tumores, la expresión de c-Raf era esencial para la aparición de estos tumores. La eliminación conjunta de c-Raf y B-Raf, en ratones adultos, no conllevaba efectos deletéreos para la homeostasis de los animales. Estos resultados indican que c-Raf juega un papel imprescindible en la mediación de las señales oncogénicas de K-Ras en este tipo de tumores, con lo que podría ser una diana para el desarrollo de terapias antitumorales.

i.ii SUMMARY

We have interrogated the role of individual members of the Raf/Mek/Erk cascade in the onset of *K-Ras* oncogene-driven non-small-cell lung cancer (NSCLC). Ablation of Erk1 or Erk2 in *K-Ras* oncogene expressing lung cells had no significant effect due to compensatory activities. Yet, elimination of both Erk kinases completely blocked tumor development. Similar results were obtained with Mek kinases. No such compensatory activities were observed among Raf kinases. Whereas ablation of *B-Raf* had no effect on tumor development, c-Raf expression was essential for the onset of NSCLC. Concomitant elimination of *c-Raf* and *B-Raf* in adult mice had no deleterious consequences for normal homeostasis. These results indicate that c-Raf plays a unique role in mediating K-Ras oncogenic signaling in these kinds of tumors and makes it a suitable target for therapeutic intervention.

ÍNDICE

i.i Resumen.....	i
i.ii Summary.....	i
1. Índice.....	1
2. Abreviaturas.....	5
3. Introducción.....	11
3.1 Cáncer de pulmón.....	13
3.1.1 Estadísticas del cáncer de pulmón.....	13
3.1.2 Tipos de cáncer de pulmón.....	13
3.1.3 Mutaciones frecuentes en carcinoma de pulmón.....	14
3.2 Las proteínas Ras.....	14
3.2.1 La familia Ras.....	15
3.2.2 Activación de las proteínas Ras.....	15
3.2.3 El bloqueo de K-Ras como terapia antitumoral.....	16
3.3 Vías de señalización de Ras.....	18
3.3.1 Vía PI3K-Akt.....	19
3.3.2 Vía Erk-Mapk.....	21
3.3.2.1 Las proteínas Raf.....	21
3.3.2.1.1 B-Raf.....	22
3.3.2.1.2 c-Raf.....	23
3.3.2.1.3 A-Raf.....	24

3.3.2.2 Las proteínas Mek.....	24
3.3.2.3 Las proteínas Erk.....	26
3.4 Inhibidores de la vía Erk-Mapk en cáncer de pulmón.....	29
3.5 Uso de modelos murinos en el estudio del cáncer de pulmón.....	30
3.6 K-Ras^{G12V}: Un modelo murino para el adenocarcinoma de pulmón.....	31
 4. Objetivos.....	 33
 5. Material y Métodos.....	 37
5.1 Mantenimiento de las líneas animales.....	39
5.1.1 Procedencia de las líneas empleadas en este trabajo.....	39
5.1.2 Estabulación y experimentación.....	39
5.1.3 Genotipaje.....	39
5.1.3.1 Extracción de DNA.....	39
5.1.3.2 PCR.....	40
5.2 Procedimientos con animales.....	41
5.2.1 Generación de adeno-Cre y adeno-Flipasa.....	41
5.2.1.1 Generación del adenovirus y concentración en un gradiente de CsCl.....	41
5.2.1.1 Titulación del adenovirus.....	42
5.2.2 Inoculación adenoviral.....	42
5.2.3 Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno.....	43
5.2.4 Tratamiento de tamoxifeno en la dieta.....	43
5.2.5 Tomografía Axial Computerizada (CT).....	43
5.3 Histopatología e Inmunohistoquímica.....	44
5.3.1 Histopatología.....	44
5.3.2 Tinción X-Gal <i>whole mount</i> y recuento de tumores.....	44
5.3.3 Tinción X-Gal en cortes de criostato.....	44
5.3.4 Tinción β -galactosidasa Asociada a Senescencia (SA- β -gal).....	45
5.3.5 Inmunohistoquímica.....	45

5.4 Análisis de proteínas.....	45
5.4.1 Extracción y cuantificación de proteínas de tejidos y tumores.....	45
5.4.2 Electroforesis e Inmunoblot.....	46
5.5 Southern Blot.....	46
5.5.1 Extracción de DNA procedente de tejidos.....	46
5.5.2 Digestión del DNA.....	47
5.5.2 Electroforesis y transferencia.....	47
5.5.3 Hibridación de la sonda y revelado.....	47
5.6 Cultivos celulares.....	48
5.6.1 Curvas de proliferación.....	48
5.6.2 Inmortalización.....	49
5.7 Cálculos estadísticos.....	49
 6. Resultados.....	 51
6.1 La eliminación de Erk1 o Erk2 no previene el desarrollo de adenomas y adenomas y adenocarcinomas de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V}.....	53
6.2 La vía Erk-Mapk es esencial para el desarrollo de tumores inducidos por la la expresión de K-Ras^{G12V}, pero también para la homeostasis del ratón.....	56
6.3 Los tumores de pulmón inducidos por la expresión de K-Ras^{G12V} pueden desarrollarse en ausencia de Mek1 o Mek2.....	60
6.4 La ausencia de las isoformas Mek1/2 impide el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón, pero provoca efectos deletéreos especialmente en el epitelio intestinal.....	63
6.5 Distinta contribución de las proteínas Raf al desarrollo de tumores de pulmón inducidos por la expresión del oncogén K-Ras^{G12V}.....	66
6.5.1 Desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón inducidos por K-Ras ^{G12V} en ausencia de B-Raf.....	68
6.5.2 La supresión de c-Raf impide el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por K-Ras ^{G12V} , sin provocar efectos deletéreos su eliminación sistémica.....	71

6.5.3 La escisión eficiente de B-Raf y c-Raf en la mayoría de los tejidos no implica consecuencias en la salud general del ratón adulto.....	74
6.6 La ausencia de c-Raf impide el incremento del número de células que expresan K-Ras^{G12V}, por un mecanismo diferente a la apoptosis o a la senescencia.....	76
6.7 La diferente acción de las proteínas Raf, en condiciones de expresión de K-Ras^{G12V}, depende del contexto celular.....	79
6.8 Estudio del papel de c-Raf en el mantenimiento y progresión de tumores de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V}.....	82
7. Discusión.....	87
7.1 El papel esencial de las proteínas Erk: Desarrollo del tumor frente a su necesidad para la homeostasis del animal.....	89
7.2 Las proteínas Mek: El balance entre la esencialidad para el tumor y los posibles problemas emergentes de su uso terapéutico.....	92
7.3 La esencialidad de c-Raf en NSCLC frente a la dispensabilidad de B-Raf.....	94
7.4 Posible especificidad de tejido de la acción oncogénica de c-Raf.....	100
7.5 Posibles implicaciones terapéuticas de la inhibición de c-Raf.....	101
8. Conclusiones.....	105
9. Referencias.....	109
10. Anexo.....	127

2. Abreviaturas

2. Abreviaturas

Adeno-Cre:	Adenovirus que llevan codificada la recombinasa Cre.
Adeno-Flipasa:	Adenovirus que llevan codificada la recombinasa Flipasa.
β -gal:	β -galactosidasa.
β -geo:	β -galactosidasa / neomicina.
CC10:	Clara Cell 10 . Proteína de las células clara.
Cdks:	Cycline dependent kinases . Quinasas dependientes de ciclinas.
CPE:	Citopatic Effect . Efecto citopático.
CR:	Conserved Region . Región Conservada.
CRD:	Cysteine-Rich Domain . Dominio Rico en Cisteínas.
CT:	Computed Tomography . Tomografía Axial Computerizada.
DAG:	Diacylglycerol .
DMBA:	Dimetilbezantraceno .
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium . Medio mínimo esencial de Dulbecco.
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor . Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.
Erk:	Extracellular signal-regulated kinases . Quinasas reguladas por señales extracelulares.
FBS:	Fetal Bovine Serum . Suero Bovino Fetal.
GAP:	GTPase-Activating Protein . Proteína Activadora de la GTPasa.
GDP:	Guanosine diphosphate . Guanosin difosfato.
GEF:	Guanine nucleotide Exchange-Factor . Factor de Intercambio de nucleótidos de Guanina.
GFP:	Green Fluorescent Protein . Proteína Verde Fluorescente
GGTasal:	Geranyl Geranyl Transferasa I .
GTP:	Guanosine triphosphate . Guanosin trifosfato.
H&E:	Hematoxiline & Eosine . Hematoxilina y Eosina.
IFT:	Inhibidor de la Farnesil Transferasa .
IP ₃ :	Inositol-1, 4, 5-Triphosphate . Inositol-1, 4, 5-Trifosfato.
IRES:	Internal Ribosomal Entry Site . Sitio interno de entrada del ribosoma.
Mapk:	Mitogen-activated protein kinases . Proteína quinasas activadas por mitógenos.
Mek:	Map Erk Kinase . Quinasa estimulada por mitógenos de Erk.
MEFs:	Mouse Embryonic Fibroblasts . Fibroblastos embrionarios de ratón.
mTOR:	mammalian Target of Rapamycin . Diana de la Rapamicina de mamíferos.
MTT:	3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

NF1:	Neurofibromatosis 1.
NSCLC:	Non-Small-Cell Lung Cancer. Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas.
4-OHT:	4-hidroxitamoxifeno.
PCR:	Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PDGFR:	Platelet-Derived Growth Factor Receptor. Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
PDK1:	Phosphatidylinositol-Dependent Kinase-1. Quinasa Dependiente de Fosfatilinositol-1.
PFU:	Plaque-forming unit. Unidad formadora de placas.
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. Fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato.
PIP ₃ :	Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate. Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato.
PI3K:	Phosphoinositol-3-Kinase. Fosfoinositol-3-Quinasa.
PKA:	Protein Kinase A. Proteína Quinasa A.
PKB:	Protein Kinase B. Proteína Quinasa B.
PKC:	Protein Kinase C. Proteína Quinasa C.
PLC ϵ :	Phospholipase Cϵ. Fosfolipasa C ϵ .
PP1:	Protein phosphatase 1. Proteína fosfatasa 1
PP2A:	Protein phosphatase 2A. Proteína fosfatasa 2A.
PTP:	Protein Tyrosine Phosphatase. Tirosina Proteína Fosfatasa.
p90RSK:	p90 Ribosomal S6 Kinase. Quinasa S6 Ribosomal de 90 kDa.
RaIGDS:	Ral Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator. Estimulador de la Disociación de los nucleótidos de Guanina de Ral.
RB:	Retinoblastoma.
RBD:	Ras Binding Domain. Dominio de Unión a Ras.
RT:	Room Temperature. Temperatura ambiente.
RTK:	Receptor Tyrosine Kinase. Receptor Tirosina Quinasa.
SCLC:	Small-Cell Lung Cancer. Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas.
SPC:	Surfactant Protein C. Proteína del Surfactante Pulmonar C.
TCID ₅₀ :	Tissue Culture Infectious Dose, 50%. La dosis de un agente infeccioso que provoca efecto citopático en el 50% de los cultivos inoculados.
TF:	Transcription Factor. Factor de Transcripción.

2. Abreviaturas

TPA:	Tetradecanoforbol acetato.
TSC:	<i>Tuberous Sclerosis Complex</i> . Complejo de Esclerosis Tuberosa.
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> . Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.
VEGFR:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> . Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

3. Introducción

3.1 Cáncer de pulmón

3.1.1 Estadísticas del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más frecuente en el mundo y supone alrededor de 1.1 millones de muertes anuales (aproximadamente un 17.8% del total de las muertes por cáncer). La frecuencia de esta enfermedad es ligeramente mayor en los países occidentales (22%) que en los países no desarrollados (14%) (Travis et al., 2004). Con respecto al sexo, este tipo de tumor es 2.7 veces más frecuente en hombres que en mujeres (Travis et al., 2004). En países occidentales, como EE.UU, donde el número de mujeres que ha estado expuesto al tabaco ha sido históricamente mayor, el porcentaje de muertos y enfermos se iguala entre hombres y mujeres (Jemal et al., 2010) (**Figura 1**). Así, el tabaco es el mayor factor de riesgo, pudiendo ser atribuidos, en hombres, el 85-90% de los casos al consumo de esta droga (Travis et al., 2004). La prognosis de este tipo de cáncer es muy pobre, con una supervivencia a 5 años del 10% en la mayoría de los países.

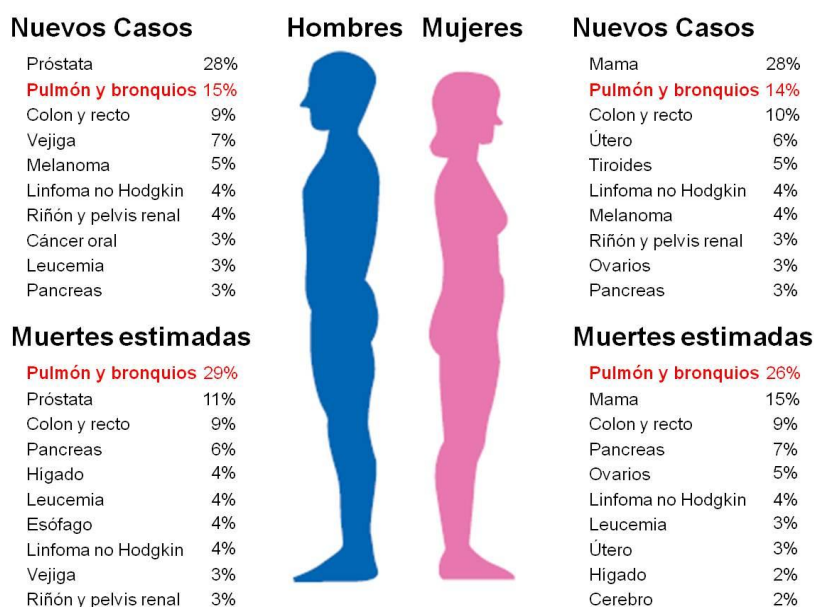


Figura 1. Porcentaje estimado de nuevos casos de cánceres y muertes debidas a estas enfermedades en los Estados Unidos durante el año 2010 (Modificado de Jemal et al., 2010).

3.1.2 Tipos de cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se puede dividir, atendiendo a su histopatología, en dos grandes grupos, el carcinoma de pulmón de células pequeñas o microcítico (en inglés *Small Cell Lung Cancer*, SCLC) y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (en inglés *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC). El primero se define por células pequeñas con escaso citoplasma, redondeadas, ovaladas o con forma de huso, con nucléolo ausente o discreto, y marcadores neuroendocrinos (Travis et al., 2004). Este carcinoma supone alrededor de un 18% del total de los tumores de pulmón, y tiene una menor respuesta

3. Introducción

a la quimioterapia y radioterapia (Meuwissen y Berns, 2005). La tasa de supervivencia a los 5 años es tan solo del 5% (Worden y Kalemkerian, 2000).

Los carcinomas que no se ajustan a estas características, los carcinomas de pulmón de células no pequeñas (en adelante NSCLC), suponen el 80% del total de los tumores malignos de pulmón. Se pueden dividir en 4 principales subgrupos atendiendo a su histopatología: adenocarcinomas, carcinoma epidermoide, carcinoma bronquioalveolar y carcinoma de células grandes (Travis, 2002), siendo los dos primeros los más frecuentes (Meuwissen y Berns, 2005). La supervivencia a 5 años de este tipo de tumores se estima en un 14% (Travis et al., 1995).

El trabajo en adelante expuesto se basa en el uso de un modelo murino de adenocarcinoma, que por otra parte es el tipo de NSCLC más frecuente. El adenocarcinoma de pulmón es un tipo de tumor epitelial maligno con diferenciación glandular, que puede mostrar diferentes patrones arquitecturales de crecimiento: acinar, papilar, bronquioalveolar, sólido con mucina o una mezcla de varios patrones (Travis et al., 2004).

3.1.3 Mutaciones frecuentes en carcinomas de pulmón

Existen algunos genes que frecuentemente se encuentran mutados en los tumores de pulmón. Así, las mutaciones inactivantes del supresor tumoral *TP53* se dan en el 50% de los NSCLC y en el 70% de los SCLC. Las segundas mutaciones más frecuentes se dan en la vía de RB. Así por ejemplo, la pérdida de expresión de RB se da entre el 80-100% de los SCLC de alto grado, aunque es menos frecuente en los NSCLC (15%) (Travis et al., 2004).

Sin embargo, hay otro tipo de mutaciones, que no siendo tan frecuentes en el global de tumores de pulmón, son las más frecuentes dentro de un tipo histopatológico concreto. Así, las mutaciones en el codón 12 del locus de *K-RAS* se han encontrado en aproximadamente un 30%-40% de los adenocarcinomas de pulmón, pero es una mutación extremadamente rara en otros tipos de NSCLC o en los SCLC (Travis et al., 2004). Esta mutación es un marcador de mala prognosis de los NSCLC (Graziano et al., 1999).

3.2 Las proteínas Ras

Como se ha mencionado, existe una importante relación entre las oncoproteínas K-RAS y los adenocarcinomas de pulmón. Debido a este hecho, siempre se ha pensado en la inhibición de esta proteína como posible tratamiento frente a este tipo de NSCLC. En este aspecto, es importante reseñar cómo se regula K-Ras y que funciones tiene en la célula, con el objetivo de analizar todas las posibles formas de bloquear su actividad.

3.2.1 La familia Ras

La familia Ras tiene cuatro miembros: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras 4B. Los dos últimos se generan por un *splicing* alternativo a partir de dos exones diferentes en el locus de *K-Ras* (Capon et al., 1983; George et al., 1985; McGrath et al., 1983; Shimizu et al., 1983). Como K-Ras 4B es la isoforma más abundante (Pells et al., 1997; Wang and You, 2001) se la suele denominar simplemente como K-Ras. Ras viene del inglés **Rat Sarcome** (Sarcoma de Rata) puesto que fue inicialmente identificado en retrovirus, en los cuales se encontraron secuencias transformantes que procedían del genoma murino, que generaban sarcomas al infectar ratas recién nacidas. Así, el nombre de los diferentes genes tiene su origen en las cepas virales: H-Ras, por Ha-Ras (virus Ha-MSV de Harvey) y K-Ras, por Ki-Ras (virus Ki-MSV de Kirsten). Fue después cuando se encontró una homología entre las secuencias existentes en líneas celulares de tumores humanos, y las encontradas en estos retrovirus. Posteriormente se descubrió N-Ras, el cual fue clonado de líneas de neuroblastoma y leucemia (Revisado por Karnoub y Weinberg, 2008; Malumbres y Barbacid, 2003).

Las tres proteínas Ras presentan un dominio amino terminal muy conservado, con una homología entre el 90 y el 100%. Sin embargo, en el extremo carboxilo terminal existe la denominada región hipervariable. Es en esta región donde se encuentra el dominio –CAAX, el cual permite la unión de Ras a la membrana. Todas las proteínas Ras son modificadas en este dominio por la enzima citosólica farnesil transferasa, la cual añade un grupo farnesilo. Esta modificación conduce a todas las proteínas Ras al retículo endoplasmático, donde es eliminado el tripéptido AAX y son metiladas. A partir de aquí las modificaciones post-traduccionales son diferentes. K-Ras se dirige directamente hacia la membrana, y su dominio de polilisina le permite la interacción con las cargas negativas de la misma. H y N-Ras sufren una segunda modificación lipídica, la palmitoilación, llevada a cabo por la palmitoil transferasa (dos palmitoilaciones en H-Ras y una en N-Ras). Esta diferencia en las modificaciones post-traduccionales conlleva una diferente sublocalización en la membrana y diferencias en la señalización. Así, H-Ras se encuentra localizada en los *lipid rafts*, regiones muy poco fluidas de la membrana, mientras que K-Ras se encuentra en regiones desorganizadas de la membrana (*non-lipid rafts*, debido a que son mucho más fluidas y permiten una movilidad mayor) (Revisado por Hancock, 2003).

3.2.2 Activación de las proteínas Ras.

Las proteínas Ras son GTPasas, es decir, tienen la capacidad intrínseca de hidrolizar GTP quedando unidas a GDP. Ras se encuentra en su estado activo cuando está unido a GTP, actuando como mediador citoplasmático de señales que llegan a la membrana, siendo este estado transitorio, ya que la hidrólisis del GTP supone la inactivación de Ras.

3. Introducción

En la regulación de este ciclo de Ras (**Figura 2**) intervienen otras proteínas. De esta manera, la activación de Ras está catalizada por unas proteínas denominadas GEFs (*Guanine nucleotide-Exchange Factors*), al favorecer su unión a GTP y la consecuente liberación del GDP unido. El primer GEF descubierto fue Cdc25, en *Saccharomyces cerevisiae* (no confundir con la proteína implicada en el ciclo celular) (Broek et al., 1987; Robinson et al., 1987). Su equivalente en mamíferos, SOS, fue identificado y clonado posteriormente (Downward et al., 1990; Shou et al., 1992; Wei et al., 1992; West et al., 1990; Wolfman y Macara, 1990). Otras proteínas que actúan como SOS han sido posteriormente identificadas (**Figura 2**). La conexión entre SOS y las señales que llegan a la membrana viene dada por Grb2, proteína que interacciona, gracias a sus dominios SH2, con los Receptores Tirosina Quinasa (designados en adelante por sus siglas inglesas, RTKs) fosforilados, y por tanto activados (Karnoub y Weinberg, 2008; Malumbres y Barbacid, 2003).

Como en cualquier otro proceso biológico, la transmisión de una señal tiene que ser controlada en su duración. Debido a que la actividad GTPasa de Ras es bastante débil, otras proteínas ayudan a incrementar esta capacidad catalítica, las GAPs (*GTPase-Activating Proteins*, Proteínas Activadoras de la GTPasa). La primera RasGAP se indentificó al observarse que había factores solubles que incrementaban la actividad de H-Ras o N-Ras silvestres, pero no la de formas oncogénicas (Gibbs et al., 1988; Trahey y McCormick, 1987; Trahey et al., 1988; Vogel et al., 1988). Además, este proceso estaba conectado con los RTKs, ya que se vio que la activación del PDGFR promovía la fosforilación de esta RasGAP, impidiendo su translocación a la membrana (Molloy et al., 1989). La importancia reguladora de estas GAPs quedaba patente cuando se vio que la segunda RasGAP identificada, NF1, se encontraba alterada en pacientes de neurofibromatosis (Ballester et al., 1990; Martin et al., 1990; Wallace et al., 1990; Xu et al., 1990). Otras RasGAPs han sido descritas posteriormente (**Figura 2**).

Este ciclo de activación de Ras se ha encontrado alterado en tumores humanos. Así las mutaciones en el codón 12 de *K-RAS*, identificadas en adenocarcinomas de pulmón, interrumpen la actividad GTPasa de *K-RAS*. De este modo, *K-RAS* queda permanentemente unido a GTP y por tanto constitutivamente activo. Las mutaciones en el codón 13 y 61 tienen las mismas consecuencias, aunque son menos frecuentes (Revisado por Karnoub y Weinberg, 2008; Malumbres y Barbacid, 2003).

3.2.3 El bloqueo de K-Ras como terapia antitumoral

Las primeras aproximaciones, en la época de la terapia génica, trataban de emplear oligonucleótidos antisentido que se unieran al mRNA de Ras. Mediante un vector viral, y por vía traqueal, se introducían estos oligonucleótidos en ratones inmunocomprometidos, a los que previamente se les había inoculado una suspensión de líneas celulares humanas con mutaciones en *K-RAS*. De esta manera, se conseguía una reducción del 70% en el número de tumores de pulmón (Georges et al., 1993).

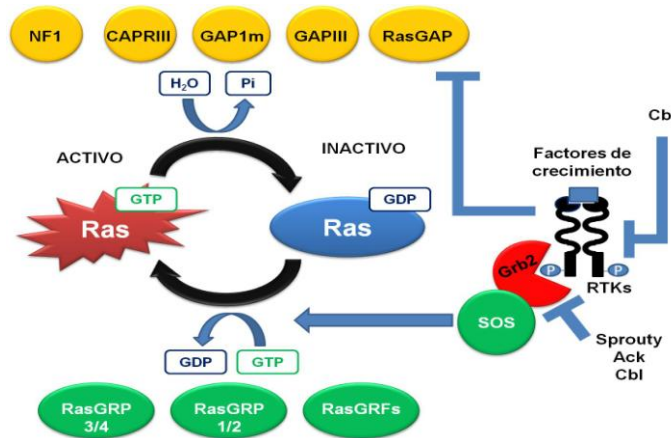


Figura 2. Ciclo de activación de Ras (Modificado de Malumbres y Barbacid, 2003). Ras es activado ante diversos estímulos extracelulares mediados por RTKs (en la figura), aunque también por proteínas G heterotriméricas y moléculas de adhesión. Estos estímulos actúan sobre RasGEFs (verde) y RasGAPs (naranja). Otras proteínas que intervienen en la regulación son la familia Sprouty y Ack, las cuales se unen a Grb2 impidiendo que lo haga SOS. Cbl tiene una función similar, pero también puede inhibir la señal por ubiquitinación de los RTKs.

El problema de este tipo de aproximación era la baja vida media de estas moléculas antisentido y que, a pesar de las mejoras habidas en la tecnología del RNA interferente, los vectores adenovirales o retrovirales que se empleaban no conducían específicamente estas moléculas a las células diana. También fueron generados anticuerpos frente a las formas oncogénicas. Éstos eran expresados en las células tumorales tras una infección adenoviral (van Etten et al., 2002). Sin embargo se planteaban los mismos problemas arriba expresados, dificultades técnicas para hacer llegar el virus al tumor.

Al plantearse estos problemas en el bloqueo de la expresión de los oncogenes, se pensó en evitar su localización en la membrana, localización subcelular donde tiene lugar su acción. Así, se comenzaron a generar inhibidores contra la farnesil transferasa (IFTs). Se mostró que los IFTs inhibían o retrasaban el desarrollo de tumores humanos xenotransplantados (Kohl et al., 1994). También demostraron cierta actividad antitumoral en modelos transgénicos de *H-Ras* con ciertos efectos tóxicos (Kohl et al., 1995). Muchos de los inhibidores se llevaron a ensayos clínicos, alcanzando alguno la fase III (Downward, 2003). Sin embargo, estos inhibidores no cumplieron las expectativas iniciales (Sebti y Der, 2003). La explicación a este fracaso se obtuvo al generarse un modelo de *knock out* condicional para el gen de la farnesil transferasa (Mijimolle et al., 2005). La ausencia de la farnesil transferasa no impedía el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} (modelo explicado más adelante). Se ha demostrado que, aunque la farnesil transferasa es la principal enzima responsable de la isoprenilación de Ras, la geranil geranil transferasa I (GGTasaI) puede también realizarlo (James et al., 1995; Rowell et al., 1997). Por tanto, esta última compensaba la ausencia de la farnesil transferasa.

Una última opción sería actuar directamente sobre Ras. El problema que planteaba esta aproximación es que las mutaciones oncogénicas más frecuentes en Ras (codones 12, 13 y 61) son

3. Introducción

inactivantes, por tanto habría que reactivar la enzima o evitar que quedara unida a GTP. La gran afinidad que presenta Ras por GTP ha hecho que se abandone la idea de buscar análogos de GTP, los cuales bloquearían el sitio de unión de Ras a este nucleótido (Young et al., 2009).

Por tanto, como todos los intentos de bloquear Ras, a nivel de expresión, localización o actividad, no han tenido éxito, se pensó en actuar sobre las vías de señalización que median la acción de Ras. La idea era bloquear vías importantes para el tumor, sobre las que pudieran actuar fármacos de forma eficaz y cuya inhibición no resultara en fuertes efectos tóxicos para el paciente.

3.3 Vías de señalización de Ras

Las proteínas Ras están implicadas en la activación de diversos efectores (**Figura 3**), los cuales pertenecen a vías de señalización que regulan diferentes funciones celulares, muchas de ellas claves en el desarrollo y mantenimiento de tumores.

Así por ejemplo están implicadas en la activación de Tiam1. Esta proteína es un GEF responsable de la activación de las GTPasas monoméricas Rac, las cuales regulan procesos como la polaridad, adhesión y motilidad celular (Lambert et al., 2002). Se ha visto que los ratones *Tiam1*^{-/-} presentaban resistencia a carcinogénesis epitelial inducida por DMBA (compuesto que provoca la mutación de *H-Ras*), sugiriendo que era necesario para la transformación inducida por Ras (Malliri et al., 2002). Por otro lado, los pocos tumores que crecían tenían un mayor índice apoptótico pero una mayor invasividad, indicando papeles contrapuestos de esta proteína en iniciación, mantenimiento y progresión.

Otro efector de Ras es PLC ϵ . Esta fosfolipasa genera Diacilglicerol (DAG) e Inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP₃) a partir de fosfatidil inositol-4, 5-difosfato. El IP₃ está implicado en la liberación de los depósitos intracelulares de Ca²⁺, actuando éste como segundo mensajero. El DAG interviene en la activación de PKC (Bunney y Katan, 2006). Estos segundos mensajeros también están implicados en la regulación de la actividad de Ras, al activar diferentes RasGAPs o RasGEFs (Revisado por Malumbres y Barbacid).

También hay otros efectores peor caracterizados. RIN1 actúa como sistema de retroalimentación negativo de Ras y ha sido encontrado silenciado en algunos tumores de mama (Milstein et al., 2007). Aunque el mecanismo no está muy claro podría tener que ver con su asociación a c-Raf, o como GEF para RAB5, proteína que promovería la endocitosis de factores activadores de Ras, como EGFR (Tall et al., 2001). También para las proteínas RASSF se ha descrito un papel antitumoral al tener propiedades proapoptóticas (van der Weyden y Adams, 2007). AF6, contiene dominios de unión a microtúbulos y a la actina. Por tanto, esta proteína tendría una acción sobre el citoesqueleto (Ponting y Benjamin, 1996).

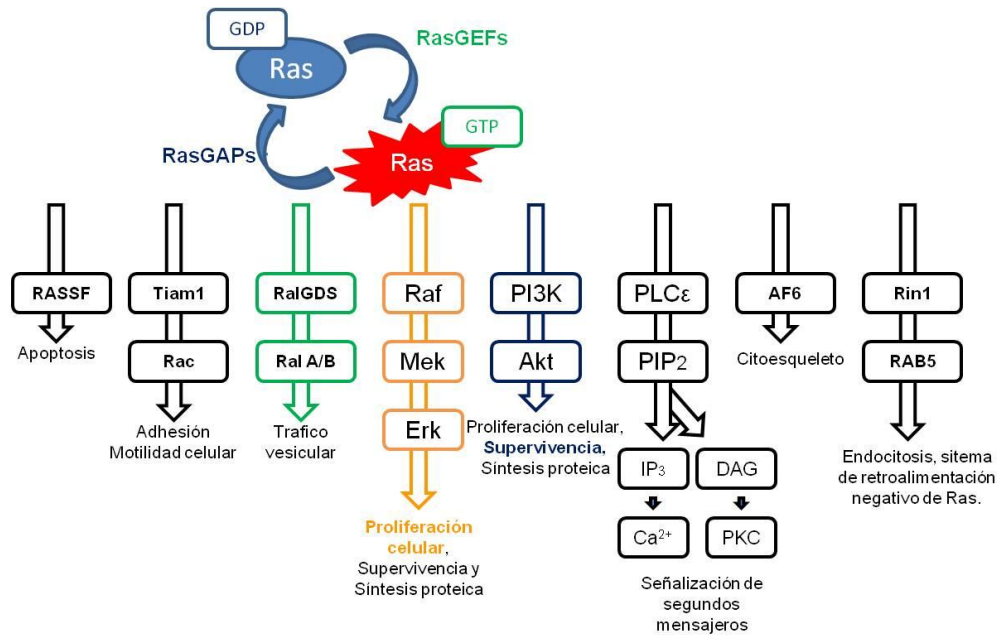


Figura 3. Diferentes vías efectoras de la señalización de Ras.

En cualquier caso, las tres vías efectoras mejor caracterizadas son la de RalGDS, PI3K-Akt y Erk-Mapk. RalGDS (*Ral Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator*) es el responsable de la activación de las proteínas Ral (RalA y RalB), las cuales están implicadas en el tráfico vesicular. Se ha demostrado que la presencia de RalGDS es necesaria para la carcinogénesis epitelial (Gonzalez-Garcia et al., 2005). Las vías de PI3K-Akt y de Erk-Mapk son aquellas sobre las cuales se ha enfocado más la búsqueda de dianas antitumorales. Por ello son analizadas a continuación con un mayor detenimiento.

3.3.1 Vía PI3K-Akt

La activación de PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*, Fosfolinositol-3-Quinasa) no solo está regulada por la activación de Ras, sino que también puede ser activada por RTKs y proteínas G heterotriméricas. PI3K está formada por una subunidad reguladora, p85, y una subunidad catalítica, p110 (de la que existen varias isoformas). Su función es fosforilar el fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato (PIP₂), en la cara interna de la membrana, para dar lugar al fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP₃). Este cambio provoca que se unan a la membrana PDK1 (*Phosphatidylinositol-Dependent Kinase-1*) y Akt (también conocida como PKB, *Protein Kinase B*), activando la primera a la segunda. En esta vía es la fosfatasa PTEN la que se encarga de limitar la duración de la señal, ya que elimina un fosfato de PIP₃ generando, otra vez, PIP₂. Esta regulación tiene gran importancia en la homeostasis celular, encontrándose mutado PTEN en una gran cantidad de tumores. Por tanto, PTEN actúa como supresor tumoral (Revisado por Cully et al., 2006; Engelman et al., 2006).

3. Introducción

Akt fosforila el inhibidor de ciclo celular p27^{kip} inactivándolo, y por tanto favoreciendo la entrada de la célula en ciclo celular. También fosforila a factores de transcripción FOXO, como FOXO3A, promoviendo su salida del núcleo e impidiendo que se transcriban genes como el de p27^{kip} o el de la proteína proapoptótica Bim. Por tanto, además de favorecer la entrada en el ciclo celular, favorece la supervivencia celular. Adicionalmente, en este sentido, puede fosforilar e inactivar la proteína proapoptótica Bad (Revisado por Cully et al., 2006; Engelman et al., 2006).

Otra diana de Akt es la proteína TSC2, la cual se inactiva al ser fosforilada. Normalmente TSC2 se encuentra formando dímeros con TSC1, y estos dímeros actúan como GAP de la GTPasa RHEB (inactivándola). RHEB promueve la actividad de la quinasa mTOR (*Target Of Rapamycin*, Diana de la rapamicina). TOR puede formar complejos con raptor y fosforilar S6K (proteína ribosomal) y 4EBP (un inhibidor de EIF4E, factor iniciador de la traducción), promoviendo la traducción de proteínas. Así, cuando Akt se activa, éste fosforila TSC2 rompiéndose el dímero con TSC1, RHEB permanece activo y promueve la actividad de mTOR, el cual favorece la síntesis proteica. Esta rama de la vía es también controlada por la vía Erk-Mapk (Revisado por Cully et al., 2006; Engelman et al., 2006).

Las funciones reguladas por esta vía (proliferación, supervivencia y síntesis proteica) son importantes para el desarrollo y mantenimiento de los tumores, por ello se han descrito una gran variedad de tumores asociados con alteraciones genéticas de los distintos miembros de la misma. Así, se han desarrollado inhibidores para cada uno de los miembros de la vía (Revisado por Engelman, 2009).

Estudios en ratón han demostrado que la interacción de K-Ras con PI3K es necesaria para el desarrollo de tumores promovidos por el oncogén *K-Ras*^{G12D}. El primero (Gupta et al., 2007) empleó un modelo *K-Ras*^{G12D} de activación espontánea (Johnson et al., 2001) (explicado más adelante), y se cruzó con un modelo que presentaba una alteración en la subunidad catalítica (p100α) de PI3K, la cual impedía su interacción con K-Ras. Estos animales presentaban gran resistencia al desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón. En el segundo estudio (Engelman et al., 2008), se cruzó un modelo de *K-Ras*^{G12D} de activación condicional (Jackson et al., 2001) (explicado más adelante), con un modelo *knock out* condicional y otro en línea germinal de los genes de la subunidad reguladora (p85) de PI3K. Como en el caso anterior, los animales presentaban muy pocos tumores, lo que implicaba que la vía era necesaria para el desarrollo de los mismos, pero no esencial. Sin embargo, también se ha visto que, en tumores promovidos por el oncogén *K-Ras*^{G12D}, la inhibición de PI3K no afectaba al mantenimiento del tumor (Engelman et al., 2008). Por el contrario, la inhibición combinada de Mek y PI3K producía una importante reducción del volumen tumoral. Como hecho a destacar en este estudio, la sola inhibición de Mek provocaba una importante regresión tumoral. Estos datos hacen pensar que, si bien la vía de PI3K es importante, la vía Erk-Mapk puede tener un rol central en la tumorigénesis inducida por los oncogenes K-

Ras. También se ha visto que el tratamiento con inhibidores de la vía PI3K, concretamente con rapamicina y otros que afectan a mTOR, genera un sistema de retroalimentación positiva en la vía Erk-Mapk (Carracedo et al., 2008). Todo ello hacía que el estudio de la contribución de cada uno de los elementos de esta vía tuviera aún más interés.

3.3.2 Vía Erk-Mapk

La vía Erk-Mapk (**Figura 4**) ha sido considerada tradicionalmente como la vía más importante en los tumores en los que Ras está implicado. Prueba de ello es que no se han encontrado tumores con mutaciones en *K-RAS* y *B-RAF* (uno de los efectores de la vía) (Mercer y Pritchard, 2003; Rajagopalan et al., 2002; Singer et al., 2003; Vos et al., 2003). Por el contrario, sí que se han visto tumores que presentan mutaciones tanto en *K-RAS* como en el gen de la subunidad catalítica de PI3K (Ogino et al., 2009; Simi et al., 2008). Si estas dos últimas proteínas tuvieran funciones redundantes, sus genes no se encontrarían mutados en el mismo tumor.

3.3.2.1 Las proteínas Raf

Los primeros elementos de la vía son las quinasas Raf. Existen tres quinasas Raf expresadas de forma ubicua: A-Raf, B-Raf y c-Raf (conocida así por ser el homólogo celular del oncogén retroviral v-raf, y también conocida como Raf-1, por ser la primera en ser descubierta). Las tres tienen tres regiones conservadas (*Conserved Region*, CR) (**Figura 5**), residiendo el dominio quinasa en la CR3. Una vez activado, Ras recluta a las diferentes proteínas Raf a la membrana, gracias a que poseen un dominio de unión a Ras (*Ras Binding Domain*, RBD) y una región rica en cisteínas (*Cysteine-Rich Domain*, CRD), ambos localizados en la CR1. Es aquí, en la membrana, donde tiene lugar la activación de Raf, un proceso complejo que implica la defosforilación y fosforilación de diversos residuos, proceso en el que intervienen diferentes quinasas y fosfatasa (Revisado por Wellbrock et al., 2004).

Estudios genéticos han mostrado que no existe una redundancia funcional entre ellas durante el desarrollo embrionario. Así, los ratones *A-Raf*^{-/-} llegan al nacimiento, pero mueren a los pocos días debido a problemas gastrointestinales y neurológicos (Pritchard et al., 1996). Sin embargo, los embriones *B-Raf*^{-/-} y *c-Raf*^{-/-} mueren *in utero* entre los días E10.5 y E12.5. Los primeros presentan problemas en la vascularización de la placenta (Galabova-Kovacs et al., 2006b; Wojnowski et al., 1997). Los segundos sufren un incremento en la apoptosis de todos los tejidos, especialmente en el hígado (Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 1998). Por tanto, si no existe compensación entre ellas y no tienen diferentes patrones de expresión, estas diferencias se deben a que poseen diferentes roles.

3. Introducción

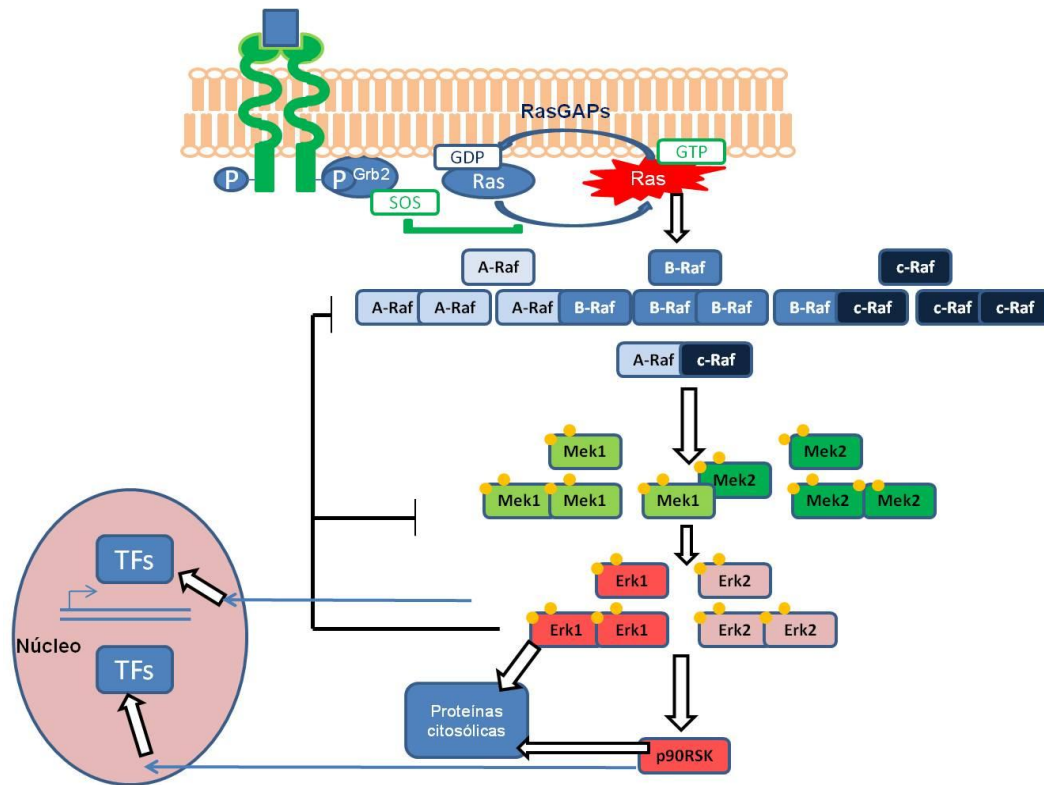


Figura 4. Vía Erk-Mapk. Una vez son activados los RTKs, por autofosforilación, estos desencadenan la activación de Ras. Ras favorece la activación de las tres isoformas de Raf (A, B y c) que se pueden encontrar en sus formas monoméricas, homodiméricas y heterodiméricas. Las proteínas Raf activan, mediante la fosforilación de dos residuos, a las proteínas Mek1 y Mek2, que también pueden encontrarse como monómeros, homodímeros y heterodímeros. Finalmente las proteínas Mek fosforilan a Erk1 y Erk2 (sólo se han descrito monómeros y homodímeros). Erk puede fosforilar proteínas en el citoplasma o translocarse al núcleo donde puede fosforilar factores de transcripción (TFs) activándolos. Así mismo, Erk puede fosforilar a proteínas de esta vía como mecanismo de retroalimentación negativa.

3.3.2.1.1 B-Raf

B-Raf es el principal activador de Mek. Así, B-Raf es la isoenzima Raf que mayor homología presenta con la única existente en organismos menos complejos. Además, es la que tiene mayor capacidad de fosforilar Mek *in vitro*, y los MEFs que carecen de B-Raf presentan una reducción significativa en la activación de esta vía. Adicionalmente, es la isoenzima que menos requerimientos presenta para ser activada. Esto se debe a que posee un aspártico y una serina permanentemente fosforilada (cargas negativas), en residuos equivalentes donde c-Raf y A-Raf deben ser fosforilados durante la activación. Por esto último, B-Raf, a diferencia de c-Raf y A-Raf, sólo requiere ser fosforilado en la región de activación (Revisado por Galabova-Kovacs et al., 2006a; Nialt y Baccarini, 2010).

B-Raf se encuentra mutado en diferentes tipos de tumores humanos, normalmente en la región de activación. La mutación más frecuente (90%) es la que da lugar a la oncoproteína B-Raf^{V600E} (Davies et al., 2002). Se generaron dos modelos de expresión condicional de *B-Raf*^{V600E} (Dankort et al., 2007; Mercer et al., 2005). Cuando se activaba la expresión de este oncogén en el pulmón, se desarrollaban

sólo tumores benignos que expresaban marcadores de senescencia (Dankort et al., 2007). Sin embargo, cuando el oncogén se expresaba en ausencia de los genes supresores de tumores *Trp53* o *Ink4a/Arf*, los adenomas malignizaban dando lugar a adenocarcinomas (Dankort et al., 2007). Por lo tanto, la expresión de este oncogén a niveles fisiológicos provoca senescencia. Esto mismo se ve en las hiperplasias melanocíticas benignas (*nevi*) donde se encuentra esta mutación (Pollock et al., 2003). A su vez, se ha descrito que en líneas de melanoma humano que expresan este oncogén, c-RAF podría asociarse a B-RAF^{V600E} formando heterodímeros en los que c-Raf tendría un papel inhibidor de la actividad quinasa de B-RAF^{V600E} (Karreth et al., 2009). En este sentido, se ha visto que las líneas celulares de melanoma humano presentan niveles relativos reducidos de c-RAF con respecto a B-RAF (Karreth et al., 2009).

Al igual que ocurre con las otras isoformas, B-Raf se puede encontrar en forma monomérica, homodimérica y heterodimérica, en condiciones fisiológicas. Contrariamente a los heterodímeros c-Raf: B-Raf^{V600E}, la formación de heterodímeros entre B-Raf silvestre y c-Raf produce un incremento de la actividad quinasa, siendo ésta mayor que la de monómeros y homodímeros (Garnett et al., 2005; Rushworth et al., 2006; Weber et al., 2001). Sin embargo, estos heterodímeros parecen ser poco frecuentes o poco estables (Rushworth et al., 2006). Se han descrito, en tumores humanos, mutaciones de *B-RAF* que disminuyen su actividad quinasa. Estas formas, con actividad quinasa reducida, estabilizarían la unión B-RAF: c-RAF, provocando una actividad quinasa mayor y más duradera (Heidorn et al., 2010).

3.3.2.1.2 c-Raf (Raf-1)

Como ya se ha mencionado, la activación de c-Raf y A-Raf es más compleja que la de B-Raf (**Figura 5**), y quizá por ello las mutaciones en *c-RAF*, a diferencia de *B-RAF*, son poco frecuentes en tumores humanos. Aunque c-Raf activa también a las proteínas Mek, probablemente con distinta capacidad dependiendo del tejido, se han descrito otros efectores de c-Raf (**Figura 6**). Así, c-Raf tiene diferentes efectores basados en la interacción proteína/proteína, independientes de su actividad quinasa. Uno de ellos es la serina/treonina quinasa Ask1 (Chen et al., 2001; Yamaguchi et al., 2004), impidiendo que promueva la apoptosis a través de Jnk y p38. También se une a la proteína proapoptótica Mst2 (O'Neill et al., 2004), impidiendo que ésta forme homodímeros y reclutando fosfatasa que la inactivan.

Otra enzima inhibida por c-Raf, también por interacción proteína-proteína, es Roka (Pritchard et al., 2004). Esta última regula reordenamientos citoesqueléticos y se encuentra en la vía de Rho, una GTPasa monomérica de la superfamilia de Ras. Se mostró, en un modelo murino de activación de Ras, que la eliminación de c-Raf no solo prevenía el desarrollo de tumores en la epidermis, sino que provocaba la regresión de aquellos que estaban previamente establecidos (Ehrenreiter et al., 2009). La activación de Roka inhibe, a través de sus efectores, la fosforilación del factor de transcripción STAT (bloqueando su

3. Introducción

translocación al núcleo) y la transcripción de *myc*, implicada en proliferación necesaria para mantener los progenitores de los queratinocitos. Por tanto, inhibiendo a Roka, c-Raf promueve la proliferación del tumor. Al eliminarse c-Raf se producía una regresión del tumor, al promover Roka la diferenciación de las células tumorales (Revisado por Niault y Baccarini, 2010). Adicionalmente, se ha relacionado a c-Raf con la interacción e inhibición de otras proteínas proapoptóticas, y con la activación de vías de supervivencia, siendo necesaria su actividad quinasa para algunas de ellas (**Figura 6**).

Además, se ha descrito que c-Raf puede translocarse al núcleo y formar complejos con Rb (Wang et al., 1998). En estos complejos c-Raf fosforila a Rb, sin embargo, esta fosforilación no provoca la liberación de Rb de los promotores E2F1, pudiendo ser un proceso inicial requerido para la posterior acción de los complejos ciclinas-Cdks. En este sentido, se ha visto que la unión de c-Raf a Rb coincide con la liberación de la proteína remodeladora de la cromatina Brg-1 (Dasgupta et al., 2004). Prueba de la importancia de estos complejos es que en NSCLC humanos hay un incremento de los mismos en comparación con el tejido circundante (Dasgupta et al., 2006). Así, se ha observado que pequeños péptidos o inhibidores, los cuales rompían la unión c-RAF: RB, inhibían el crecimiento de un panel de diferentes líneas celulares introducidas en ratones inmunocomprometidos, con la excepción de aquellas líneas en las que Rb no era funcional (Kinkade et al., 2008).

3.3.2.1.3 A-Raf

A-Raf es activado en una forma similar a la descrita previamente para c-Raf. A parte de su papel como activador de Mek, no se conoce ningún otro efector de A-Raf. De las tres proteínas Raf, A-Raf es la isoforma que menor capacidad ha mostrado para activar Mek *in vitro* (Revisado por Galabova-Kovacs et al., 2006a).

3.3.2.2 Las proteínas Mek

En mamíferos existen dos isoformas Mek: Mek1, más similar al homólogo de organismos menos complejos, y Mek2, habiendo una gran homología entre ellas (85% de identidad aminoacídica). Hay una tercera forma, Mek1b, generada por *splicing* alternativo de Mek1, la cual se piensa que no tiene actividad quinasa. Las proteínas Mek son activadas cuando son fosforiladas, por las proteínas Raf, en dos serinas situadas en el lazo de activación (S218 y S222 en Mek1; S222 y S226 en Mek2). La actividad de Mek cesa cuando esos residuos son defosforilados, principalmente por la serina/treonina fosfatasa PP2A. Otras fosforilaciones y defosforilaciones pueden modular la actividad de Mek. Así por ejemplo, la fosforilación en S298 de Mek1 por Pak1, podría favorecer la interacción con Raf. Una vez activadas, las proteínas Mek actúan como quinasas duales, es decir, pueden fosforilar tanto en serina/treonina como en tirosina. Hasta el momento, la única diana conocida de Mek es Erk (Revisado por Shaul y Seger, 2007).

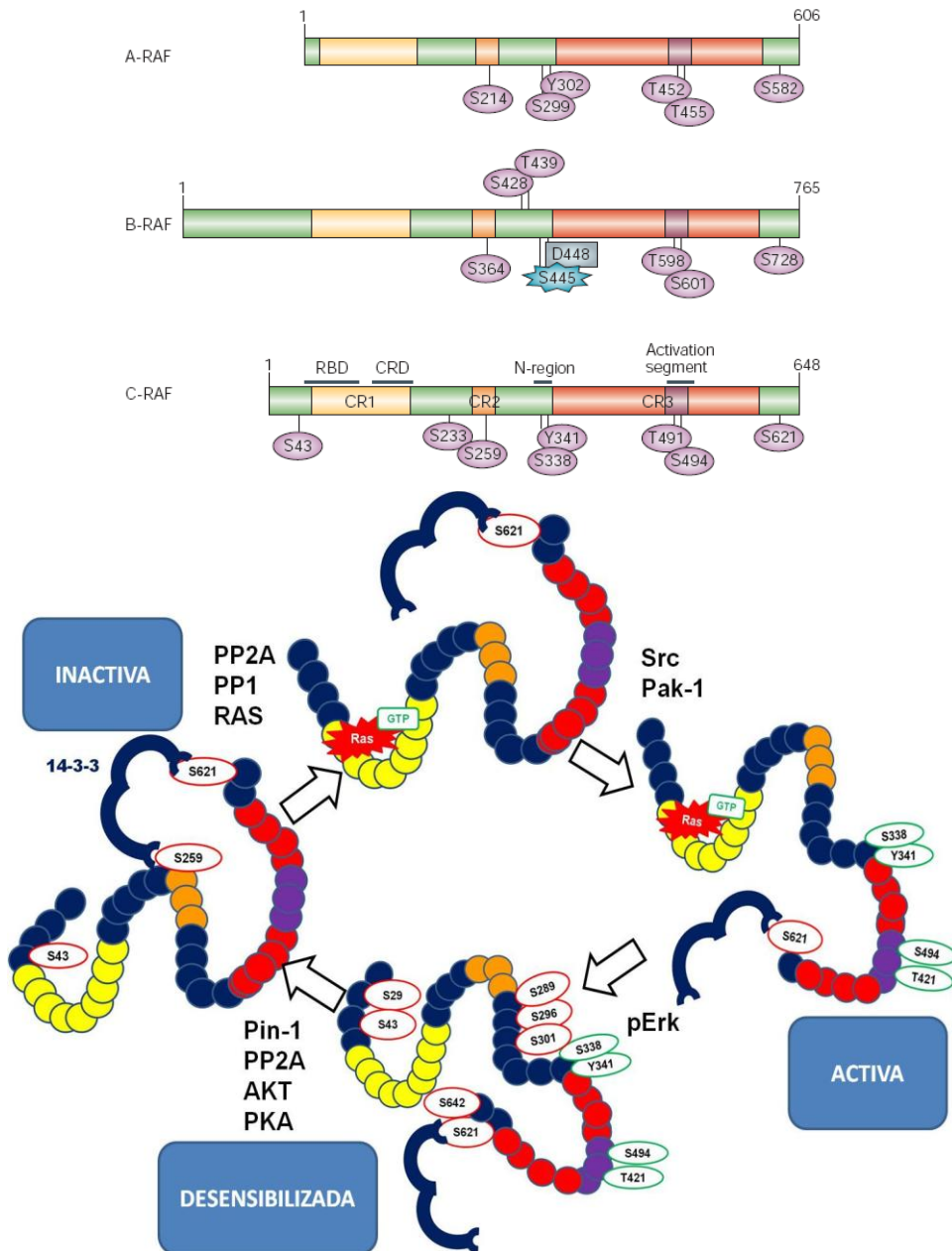


Figura 5. Estructura y activación de las proteínas Raf. Panel superior (Tomado de Wellbrock et al., 2004). Dominios de Raf. Tres regiones conservadas: CR1 (amarillo), donde se encuentran el RBD (*Ras-Binding Domain*) y el CRD (*Cysteine-Rich Domain*), implicados ambos en la unión a Ras. CR2 (naranja), donde se localiza un residuo unido a 14-3-3 y que es defosforilado durante la activación. CR3 (rojo), donde reside la actividad quinasa y el segmento de activación (violeta), en el cual hay dos residuos fosforilados durante la activación. La región N-terminal de CR3, donde se encuentran dos residuos que deben ser fosforilados para la activación de las quinasas A-Raf y C-Raf. En B-Raf hay un residuo fosfomimético (D448) y una Ser permanentemente fosforilada (S445). La S621 (de c-Raf y sus equivalentes en las otras proteínas Raf) es un residuo de unión a 14-3-3. **Panel inferior.** Secuencia de activación de c-Raf. En el estado inactivo interacciona con 14-3-3 en el residuo S259. Ras y las fosfatasa colaboran para defosforilarlo, provocando su liberación de 14-3-3 y el primer cambio conformacional. A su vez se defosforila S43, lo que parece favorecer la interacción con Ras. Para la activación definitiva es requerido que sean fosforilados S338 e Y341, en la región N-terminal de CR3, papel en el que intervienen Pak-1 y Src, y los residuos T494 y S494 (quinasas no descritas). En un sistema de retroalimentación negativo, pErk fosforila varios residuos que desensibilizan la enzima (en B-Raf S151, T401, S750 y T753). La fosfatasa PP2A, gracias a la accesibilidad que le permite la prolin isomerasa Pim1, defosforila todos estos residuos. Finalmente la quinasa Akt o la PKA, vuelven a fosforilar el residuo S259, permitiendo su reasociación con 14-3-3.

3. Introducción

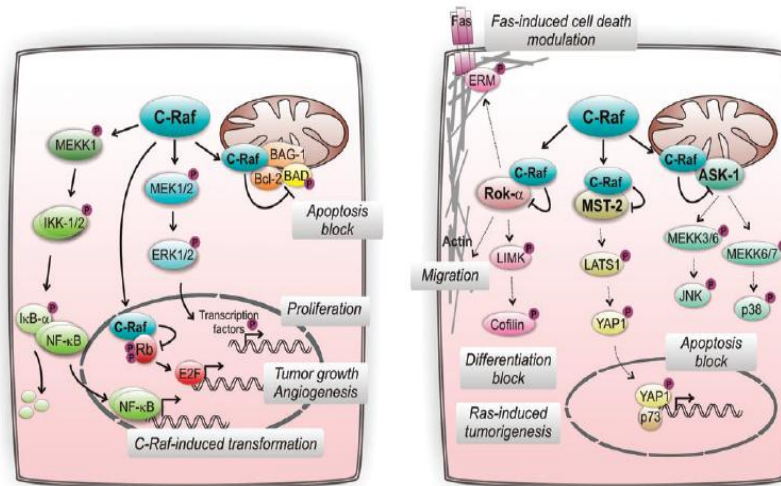


Figura 6. Efectores de c-Raf (Tomado de Nialt y Baccarini, 2010). Panel izquierdo. Efectores de c-Raf relacionados con su actividad quinasa. Panel derecho. Efectores de c-Raf independientes de su actividad quinasa.

Aunque ambas enzimas Mek tienen el mismo sustrato, la información extraída de los ratones *Mek1^{-/-}* y los *Mek2^{-/-}* indica que existen ocasiones en las que pueden jugar roles diferentes. Así, los embriones *Mek1^{-/-}* mueren por problemas de vascularización en la placenta (de similar forma a como lo hacían los *B-Raf^{-/-}*) alrededor del día E10.5 (Bissonauth et al., 2006; Giroux et al., 1999), mientras que los animales *Mek2^{-/-}* llegan a la vida adulta (Belanger et al., 2003). Así, los problemas en el desarrollo de los embriones *Mek1^{-/-}*, no pueden ser compensados por Mek2, el cual si se expresa en la placenta. Se ha descrito una región rica en prolinas, situada en el extremo C-terminal, que tiene una mayor variación entre ambas proteínas. En esta región existe un residuo en Mek1 (T292), que no existe en Mek2 (Brunet et al., 1994; Xu et al., 1999), que fosforilado sirve como sistema de retroalimentación negativo por parte de Erk. Con lo cual, hay una diferencia en la duración de la señal transmitida por ambas isoformas. Además, se han descrito diversas proteínas *scaffold* que interactúan con Mek1 y no lo hacen con Mek2 (Brunet et al., 1994; Roy et al., 2005; Schaeffer et al., 1998; Yin et al., 2004), pudiéndose así explicar porque ambas proteínas pueden tener distinta importancia, en según qué casos, aunque su función sea la misma.

Las proteínas Mek se pueden encontrar en forma monomérica u homodimérica. En un trabajo relativamente reciente, se ha descrito la formación de heterodímeros Mek1: Mek2. Dentro de estos heterodímeros, Mek1 ejercería un control sobre la actividad de Mek2. Así, aunque Mek2 no podría ser fosforilado por Erk (al no poseer el residuo T292, arriba descrito), Mek1, una vez fosforilado por Erk, podría reducir la señal que proviene de Mek2 (Catalanotti et al., 2009).

3.3.2.2 Las proteínas Erk

Existen dos isoformas de Erk: Erk1 (p44) y Erk2 (p42). Ambas son activadas por fosforilación dual en sus dos residuos reguladores de tirosina y treonina (motivo T-X-Y, T202-E203-Y204 para Erk1 y

T183-E184-Y185 para Erk2), por las quinasas duales Mek (Revisado por Shaul y Seger, 2007). Una vez activadas, las proteínas Erk pueden fosforilar una gran cantidad de sustratos (Revisado por Yoon y Seger, 2006). Algunos de ellos están localizados en el citoplasma, mientras que en otras ocasiones Erk se transloca al núcleo para fosforilar factores de transcripción y otras proteínas. Adicionalmente se puede añadir un elemento más a la cascada Raf/Mek/Erk, se trata de las quinasas S6 ribosomales de 90kDa (p90RSKs), las cuales se translocan al núcleo, una vez fosforiladas por pErk, y activan gran cantidad de sustratos. La regulación de la duración de la señal de Erk viene dada por la defosforilación de uno o ambos residuos de activación. Esta acción es llevada a cabo por serina/treonina fosfatasas (como PP2A), tirosina fosfatasas (como PTP-SL) o por fosfatasas duales (Mapk fosfatasas) (Revisado por Shaul y Seger, 2007).

Al igual que las proteínas Mek, las dos isoformas de Erk presentan una gran homología, sin embargo no existe una redundancia funcional durante el desarrollo embrionario. Los animales *Erk1*^{-/-} alcanzan la edad adulta y son fértiles (Pages et al., 1999), por el contrario, los *Erk2*^{-/-} mueren *in utero* a distintos momentos del desarrollo embrionario, dependiendo del fondo genético, debido a problemas en la vascularización de la placenta (al igual que en ausencia de B-Raf y Mek1) (Hatano et al., 2003; Saba-El-Leil et al., 2003; Yao et al., 2003). El hecho de haberse detectado Erk1 en la placenta de estos embriones (Saba-El-Leil et al., 2003) ponía de manifiesto que Erk1 y Erk2 pueden jugar diferentes papeles (ya que Erk1 no podía compensar la ausencia de Erk2) dependiendo del contexto. La existencia de proteínas *scaffold*, que interactúen diferencialmente con ambas isoformas, podría explicar este hecho. Así, MP-1, una proteína *scaffold* que se encuentra en endosomas tardíos, solo interactúa con Mek1 y Erk1 (Schaeffer et al., 1998). Sin embargo, hay trabajos que defienden que la célula necesita un umbral de activación de Erk total, y que la diferencia de importancia entre ambas isoformas podría venir dado por los diferentes niveles de expresión de una u otra (Lefloch et al., 2008; Voisin et al., 2010). Estos dos estudios solo valoran la contribución de las proteínas Erk a la proliferación, y podría ser que para determinadas situaciones y/o funciones sí que tuvieran un papel diferente, como se ha demostrado en la transformación epitelio/mesénquima (Shin et al., 2010).

Las proteínas Erk están implicadas en la regulación de diversas funciones celulares y prácticamente todas ellas guardan una estrecha relación con el desarrollo y mantenimiento de tumores. En muchas ocasiones la respuesta a la señal puede cambiar dependiendo de la intensidad o duración de la misma.

Proteínas Erk y transición G1/S

Una vez activado por fosforilación, Erk puede translocarse al núcleo donde fosforila factores de transcripción como Elk. Elk permite transcribir algunos genes como el factor de transcripción c-fos (que

3. Introducción

forma, junto con c-jun, el heterodímero AP-1). Estos factores de transcripción promueven la expresión de ciclina D, la cual se une a Cdk4/Cdk6 formando complejos que, fosforilando Rb, favorecen la liberación de los factores de transcripción E2F1 y la consecuente entrada en fase S (Revisado por Torii et al., 2006). Se ha visto que la activación de Erk tiene que ser sostenida para que se exprese ciclina D. Esto podría ser explicado porque si bien Erk promueve la expresión de los factores de transcripción c-fos, c-jun y c-myc, es necesaria una señal sostenida para fosforilarlos y estabilizarlos (Murphy y Blenis, 2006). Adicionalmente a todo lo anterior, Erk también inhibe, durante la fase G1, la transcripción de genes antiproliferativos a través de AP-1. Así, inhibe Tob1 y Jun-D, los cuales reprimen la expresión de ciclina D (Yamamoto et al., 2006).

También se sabe que Erk promueve la transcripción de inhibidores de Cdks como p21^{cip}, p27^{kip}, p16^{ink4a} y p19^{Arf}. Esta inducción es un mecanismo de control, sirviendo como sistema para detener la proliferación celular cuando hay un exceso de activación de la vía Erk-Mapk (Revisado por Meloche y Pouyssegur, 2007).

Proteínas Erk y supervivencia celular

La proteína proapoptótica Bim pertenece a la familia de proteínas Bcl-2. Su función es secuestrar a los factores de supervivencia de la misma familia, de tal forma que las proteínas proapoptóticas Bak y Bax, también pertenecientes a esta familia, quedan libres de ellos y pueden oligomerizar activando la vía mitocondrial de la apoptosis. Erk puede impedir la apoptosis desencadenada por Bim actuando a distintos niveles. Primero, reduciendo la expresión de Bim, ya que Erk promueve la degradación del factor de transcripción FOXO3a, el cual promueve la transcripción de Bim. Segundo, reduciendo los niveles de proteína, ya que Bim puede ser fosforilado en múltiples sitios en respuesta a la activación de Erk, lo cual promueve su ubiquitinación y posterior degradación. Tercero, bloqueando su función, ya que al activarse Erk, los factores de supervivencia de la familia Bcl-2 son liberados de Bim, pudiéndose entonces unir a Bak y Bax, y consecuentemente impidiendo que oligomericen. Además de todo lo anterior, Erk promueve la transcripción de estos factores de supervivencia (Revisado por Balmano y Cook, 2009).

Erk, junto a PKA y Akt, inhiben por fosforilación a la proteína proapoptótica Bad, al facilitar su unión con la proteína 14-3-3. De esta manera Bad libera a factores de supervivencia que mantenía secuestrados, impidiéndose la apoptosis a través de la vía mitocondrial (Revisado por Balmano y Cook, 2009).

Proteínas Erk y otras actividades protumorales

Además de con la proliferación y supervivencia celular, se ha relacionado la señal de Erk con otras funciones celulares que podrían ser importantes para el desarrollo y/o mantenimiento de un tumor. Así por ejemplo, se ha demostrado que p90RSK, un sustrato de Erk, o directamente Erk, pueden fosforilar

TRC2. Como vimos en la vía de PI3K, esto supone la activación de mTOR y la consecuente activación de los factores de iniciación de la traducción de proteínas (Revisado por Meloche y Pouyssegur, 2007).

Otra función con la que se puede relacionar a Erk es la angiogénesis. Los ratones *knock out* de *B-Raf*, *Mek1* y *Erk2* mueren por problemas de vascularización en la placenta. En los *knock out* de *B-Raf*, este defecto se ha relacionado con un déficit en la producción de VEGF (Galabova-Kovacs et al., 2006b).

3.4 Inhibidores de la vía Erk-Mapk en cáncer de pulmón

La hiperactivación de la vía Erk-Mapk en muchos tumores, la implicación de la misma en funciones necesarias para el desarrollo y mantenimiento de los mismos y la falta de éxito a la hora de inhibir RAS, han impulsado el desarrollo de diversos inhibidores frente a MEK y RAF.

Algunos inhibidores de MEK han sido ya testados en ensayos clínicos. MEK1/2 son proteínas que presentan pocos lugares de activación e inactivación, sus efectores son bien conocidos y sus inhibidores presentan cierta especificidad, al no ir dirigidos contra el sitio de unión del ATP (Revisado por McCubrey et al., 2010). CI-1040 (o PD384152), AZD6244 (o ARRY-142886) y PD0325901 han sido testados en ensayos clínicos frente a NSCLC, resultando baja su actividad antitumoral a las dosis toleradas. Más recientemente, el inhibidor de MEK G1120212 ha conseguido 2 respuestas parciales y 9 estabilizaciones de la enfermedad, en 14 pacientes que sufrían un NSCLC con mutaciones en *K-RAS* (<http://www.esmo.org/events/milan-2010-congress>).

Los ensayos clínicos que se han realizado para inhibidores de B-RAF (que también suelen inhibir c-RAF), se han realizado principalmente en melanoma, tipo de cáncer en el que *B-RAF* se encuentra frecuentemente mutado. Los primeros inhibidores de las proteínas RAF eran bastante inespecíficos. Así, sorafenib (BAY 43-9006) fue definido inicialmente como un inhibidor contra c-RAF, sin embargo, también tiene un gran potencial como inhibidor de B-RAF. Además ha mostrado inhibir una gran cantidad de RTKs, como el VEGFR. Adicionalmente, no ha mostrado ser un agente que pueda inhibir eficazmente B-RAF en tumores (Revisado por Flaherty y McArthur, 2010). Otros inhibidores más selectivos han sido generados recientemente. Así, el PLX4032 (RG7204) parece discriminar incluso entre B-Raf y c-Raf, y podría tener una mayor selectividad por B-Raf^{V600E}. En los últimos ensayos clínicos en pacientes con melanoma, algunos individuos presentaban respuestas totales al tratamiento y la mayoría presentaba respuestas parciales (Bollag et al., 2010; Flaherty et al., 2010). Sin embargo, en algunos pacientes se desarrollaba un carcinoma cutáneo de células escamosas. Una posible explicación podría ser que la inhibición de B-Raf estabilizaría los heterodímeros B-Raf: c-Raf en las células epiteliales, los cuales como

3. Introducción

se ha explicado con anterioridad, tienen gran actividad quinasa (Heidorn et al., 2010; Poulikakos et al., 2010).

3.5 Uso de modelos murinos en el estudio del cáncer de pulmón

Es conocido que los tumores espontáneos de los ratones guardan similitud con los tumores humanos en términos de morfología, histopatología y alteraciones moleculares (Revisado por Meuwissen y Berns, 2005). Dicho esto, unos modelos adecuados pueden hacer que el ratón se convierta en una herramienta útil para la mejor comprensión de la patología, para mejorar el conocimiento en cuanto a marcadores tumorales, así como para el desarrollo y ensayo de nuevas terapias de carácter antitumoral.

Los primeros modelos se obtuvieron al observar que ciertas líneas consanguíneas eran más propensas al desarrollo de tumores espontáneos (Revisado por Meuwissen y Berns, 2005). Lógicamente a pesar de poseer la espontaneidad de los tumores humanos, no se podían controlar las condiciones experimentales y había problemas de reproducibilidad. Posteriormente se observó que estas líneas también eran más susceptibles a los agentes químicos carcinogénicos. Además, los resultados obtenidos con carcinógenos eran reproducibles y casi invariables (Malkinson, 1989; Shimkin y Stoner, 1975). Los carcinógenos clásicamente empleados eran nitrosaminas derivadas del tabaco, hidrocarburos policíclicos aromáticos y etil carbamato. En estos experimentos, después de la aplicación del carcinógeno, aparecían algunos focos hiperplásicos. Algunos daban lugar a adenomas y de estos algunos malignizaban, dando lugar a adenocarcinomas con invasión local pero sin aparición de metástasis. Estos adenocarcinomas resultaban ser positivos para SPC, marcador de células alveolares tipo II (como ocurre en humanos) (Revisado por Meuwissen y Berns, 2005). Los estudios de estos tumores indicaban que *K-Ras* se encontraba mutado desde el estadio de hiperplasia (Horio et al., 1996). También era frecuente encontrar sobreexpresado *c-Myc* (Re et al., 1992). En los estadios finales aparecían inactivados genes supresores de tumores como *Trp53*, *Rb* o *Apc* (Malkinson, 2001).

Posteriormente, se comenzaron a usar modelos que evitaban este proceso de mutagénesis al azar. Para ello, se usaban transgénicos que expresaban oncogenes frecuentemente mutados en tumores humanos y espontáneos de ratón, o bien, animales *knock out* para inactivar genes supresores de tumores. Hasta la fecha se han realizado una gran cantidad de modelos para diferentes oncogenes y oncosupresores (Revisado por Meuwissen y Berns, 2005). Sin embargo, con el uso de estos modelos, la expresión del oncogén o ausencia de expresión del gen supresor de tumores ocurría de forma constitutiva y ubicua. Así, la situación distaba mucho de lo que ocurre en un tumor surgido a partir de una mutación esporádica en un órgano específico (Jonkers y Berns, 2002). Además, en ocasiones, el tumor se conseguía mediante expresiones suprafisiológicas de oncogenes, al utilizar promotores muy potentes.

El problema de estos transgénicos y *knock out* en línea germinal, se corrigió, en parte, por el sistema de alelos condicionales, ya que mediante ellos se puede mimetizar mejor el proceso esporádico de la tumorigénesis, controlando el órgano y el momento en el cuál se expresa el gen mutado. El mayor ejemplo es el sistema de recombinación Cre/loxP (Gu et al., 1993; Kuhn et al., 1995). En el caso de los genes supresores de tumores, una determinada región de un gen se flanquea por dos secuencias loxP. La expresión de la recombinasa Cre en un tejido y/o en un momento deseado, permite eliminar de manera controlada la expresión de esa proteína. Para los oncogenes se inserta un casete de parada de transcripción (STOP) en el extremo 5', flanqueado por sitios loxP. En este caso la expresión de la Cre lo elimina, permitiendo así la expresión del oncogén en el momento y tejido deseado. Una evolución adicional de este sistema de expresión condicional es el sistema *knock in*. Según éste, la expresión del oncogén se da bajo el control del promotor del locus endógeno, evitándose la sobreexpresión inducida en modelos transgénicos por promotores de alta actividad.

3.6 K-Ras^{G12V}: Un modelo murino, para el adenocarcinoma de pulmón

Gracias al sistema Cre/loxP se comenzaron a generar modelos murinos de tumores de pulmón. Así, la eliminación de Trp53 y Rb (como se ha dicho, genes frecuentemente mutados en SCLC), en células pulmonares de ratones, daba lugar a un modelo de SCLC (Meuwissen et al., 2003).

Uno de los primeros modelos de adenocarcinoma de pulmón presentaba un alelo oncogénico latente, *K-Ras*^{G12D}, sólo expresado tras un fenómeno de recombinación espontánea (Johnson et al., 2001). Más tarde, también en el laboratorio de Tyler Jacks, se mejoró el modelo para evitar depender del fenómeno aleatorio de la recombinación. En esta ocasión, el oncogén residente, *K-Ras*^{G12D}, no se expresaba debido a la existencia de un casete STOP de transcripción (Jackson et al., 2001). Al encontrarse este casete flanqueado por sitios loxP, la infección de estos animales con adenovirus, los cuales portaban el gen de la Cre (adeno-Cre), liberaba este casete y permitía la expresión del oncogén. El laboratorio de Anton Berns generó un modelo con la mutación *K-Ras*^{G12V} (Meuwissen et al., 2001). En esta ocasión el oncogén estaba precedido por el gen de la GFP flanqueado por sitios loxP, de tal forma que, antes de ser infectados con adeno-Cre, los animales expresaban GFP. El inconveniente de este modelo era que la expresión oncogénica estaba controlada por el promotor de la β -actina, en lugar del promotor de *K-Ras*, como lo hacían los otros dos modelos. En todos los casos aparecían hiperplasias y adenomas 4 semanas después de la infección, y adenocarcinomas entre las 9 y 12 semanas post-infección (Jackson et al., 2001; Meuwissen et al., 2001). Sin embargo, solo se detectaron fenómenos de invasión local y no metástasis. A la vez de estos, el laboratorio de Harold Varmus generó el transgénico CCSP-rtTA; (tetO₇) CMV-K-Ras^{G12D} (Fisher et al., 2001). En este modelo, y en presencia de doxiciclina, la

3. Introducción

expresión de la Cre se daba de forma específica en pneumocitos tipo II (sistema TetOn). La ventaja que presentaba este modelo es que al cesar la administración de doxiciclina, el oncogén se dejaba de expresar, observándose una regresión de los adenocarcinomas previamente formados.

Nuestro laboratorio generó un modelo que consistía en la introducción de una mutación *K-Ras*^{G12V}, en el locus endógeno de *K-Ras*, y un casete STOP en extremo 5' que bloqueaba su expresión, flaqueado por sitios loxP (Guerra et al., 2003) (**Figura 7**). Este modelo presentaba la ventaja de que en el extremo 3' del locus de *K-Ras* contenía un casete β -geo (β -galactosidasa/neomicina), el cual estaba precedido por una secuencia IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*, Sitio Interno de Entrada del Ribosoma) (Friedrich y Soriano, 1991). Con este sistema bicistrónico se expresaba, a la misma vez que el oncogén, la β -galactosidasa. De esta manera, mediante una tinción X-gal se puede identificar que células expresan el oncogén desde los primeros estadios del tumor. De igual manera que en los anteriores modelos descritos, la expresión del oncogén conlleva el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas.

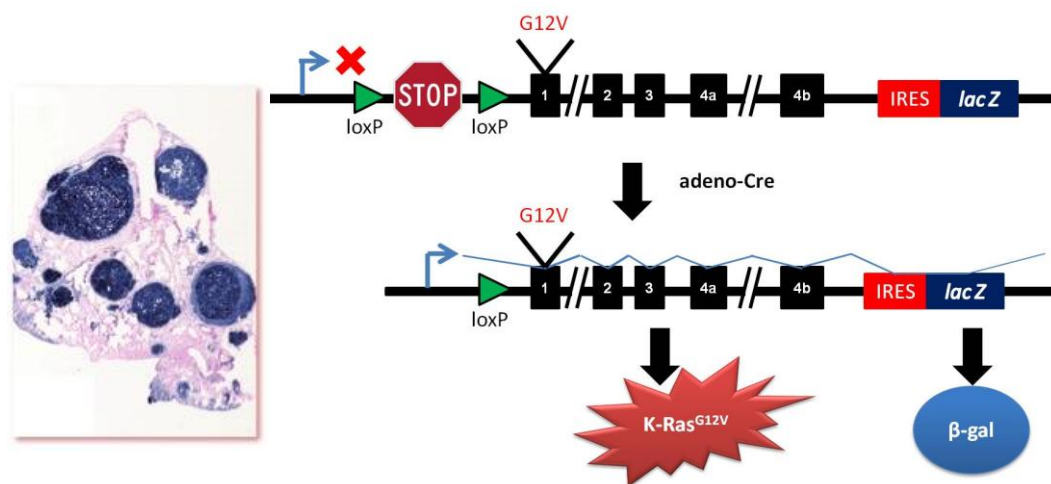


Figura 7. Representación esquemática del modelo *K-Ras*^{G12Vgeo}. Panel derecho. Situación en el locus de *K-Ras* antes de expresarse la Cre el casete STOP impide la transcripción del mensajero bicistrónico. La Cre reconoce los sitios loxP, origina la eliminación del casete STOP y con ello se expresa *K-Ras*^{G12V} y *lacZ* en un solo mensajero. La secuencia IRES, permiten la entrada de ribosomas y la traducción de *lacZ*, dando lugar a la β -galactosidasa. Panel izquierdo. Sección de parafina de pulmón de un animal *K-Ras*^{+/LSLG12Vgeo}, seis meses después de la inoculación de adeno-Cre. Adenocarcinomas y adenomas en azul, tras ser realizada una tinción X-gal.

Como ya se ha mencionado en repetidas ocasiones a lo largo de esta introducción, existen dificultades a la hora de impedir la señalización de Ras. Por este motivo, el trabajo que aquí se expone trató de analizar la contribución, mediante una aproximación genética, de cada uno de los miembros de la vía Erk-Mapk (como se ha dicho, una de las más importantes en la transmisión de la señal tumorigénica de Ras), al desarrollo de los tumores de pulmón promovidos por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}. Para ello, se cruzó el modelo de adenocarcinoma de pulmón desarrollado por nuestro laboratorio, con diferentes modelos *knock out* de cada una de los miembros de esta vía. Adicionalmente se ha estudiado el papel de estas proteínas en el mantenimiento de tumores de pulmón previamente establecidos.

4. *Objetivos*

Este trabajo presentaba los siguientes objetivos:

1. Determinar el papel de las isoformas de Erk, Erk1 y Erk2, en el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por la forma oncogénica K-Ras^{G12V}. Así mismo si estas tuvieran algún papel, estudiar cuales serían las consecuencias de su eliminación sistémica.
2. Determinar el papel de las isoformas de Mek, Mek1 y Mek2, en el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por la forma oncogénica K-Ras^{G12V}. Así mismo si estas tuvieran algún papel, estudiar cuales serían las consecuencias de su eliminación sistémica.
3. Determinar el papel de dos de las tres isoformas de Raf, B-Raf y c-Raf, en el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por la forma oncogénica K-Ras^{G12V}. Así mismo si estas tuvieran algún papel, estudiar cuales serían las consecuencias de su eliminación sistémica.
4. En el caso de que la eliminación de algunas de estas proteínas impidiera el desarrollo del tumor, estudiar, *in vivo* e *in vitro* cuales son los mecanismos moleculares responsables de este hecho.
5. Estudiar si aquellas proteínas que han demostrado ser importantes en el desarrollo del tumor, también lo serían en el mantenimiento de tumores previamente establecidos.

5. Material y Métodos

5.1 Mantenimiento de las líneas animales

5.1.1 Procedencia de las líneas empleadas en este trabajo

Las líneas *K-Ras*^{LSG12V}, *RERT* (Guerra et al., 2003) y *K-Ras*^{FSFG12V} (Drosten, datos no publicados) fueron generadas en el laboratorio de Mariano Barbacid (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Madrid, España). La línea *B-Raf*^{lox} (Chen et al., 2006) fue generada en el laboratorio de Alcino Silva (*Brain Research Institute*, UCLA. Los Ángeles, CA, EE.UU). Las líneas *c-Raf*^{lox} (Jesenberger et al., 2001) y *Mek1*^{lox} (Catalanotti et al., 2009) fueron generadas en el laboratorio de Manuela Baccarini (*Max F Perrutz Laboratories, Center for Molecular Biology*, Universidad de Viena, Austria). La línea *Mek2* (Belanger et al., 2003) fue generada en el laboratorio de Jean Charron (Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université de Laval, CRCHUQ. Quebec, Canadá). La línea *Erk1*⁻ (Pages et al., 1999) fue generada en el laboratorio de Jacques Pouyssegur (IBDC, Universidad de Niza, Francia). La línea *Erk2*^{lox} (Fischer et al., 2005) fue generada en el laboratorio de Stephen Hedrick (UCSF. San Francisco, CA, EE.UU).

5.1.2 Estabulación y experimentación

Todos los ratones utilizados en este trabajo se han mantenido en el animalario del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) según las recomendaciones de FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) y siguiendo toda la legislación vigente en la Unión Europea. Todos los experimentos descritos en esta memoria, que se realizaron sobre ratones, fueron previamente aprobados por los Comités de Bioética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III. En el animalario del CNIO los animales están sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. La iluminación durante el ciclo diurno procede de lámparas fluorescentes que emiten luz blanca (TLD 36W/840 y TLD 58W/840).

5.1.3 Genotipaje

5.1.3.1 Extracción del DNA

El DNA se obtenía de colas mediante un protocolo de extracción con sal. Para ello las colas eran incubadas durante la noche a 55°C en 500µl de tampón de lisis. Este tampón estaba compuesto de: 2% TrisHCl 1 M pH 8, 2% NaCl 5 M, 0.5% SDS, 2% EDTA 0.5 M pH 8 y 40µg de proteinasa K.

El segundo día se añadían 300µl de una solución saturada de NaCl (15 minutos en hielo). Se centrifugaban a 13000rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfería a un nuevo tubo y se añadía un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. Se centrifugaba a 13000 rpm durante 20 minutos y se descartaba el isopropanol. El precipitado de DNA se lavaba con etanol 70% y se centrifugaba a la misma velocidad durante 10 minutos. El pellet era secado a 55°C o bien durante toda la

5. Material y Métodos

noche a temperatura ambiente. Se resuspendía en 400 µl de tampón TE (10mM TrisHCl pH8, 1mM EDTA).

5.1.3.2 PCR

La mezcla de PCR, por muestra, contenía: Tampón de la Polimerasa Taq 1X, 1.25 µl MgCl₂ 25mM, 0.5 µl dNTPs 10mM, 0.1 µl BSA 10 mg/ml, 0.1 µl Polimerasa Taq (5 u/µl EcoTaq, *Ecogen*), cebadores 1:1 ó 2:1:1 (10 µM, *Sigma*), 1µl de DNA y se completaba con agua MiliQ hasta un volumen final de 20µl.

Los cebadores empleados fueron:

K-Ras^{LSLG12V}; Kras2f_16B5 CGTCCAGCGTGCCTAGACTTTA, Kras2r_15B9 ACTATTTTCATACTGGGTCTGCCTT, NeoF_2B1 TGACCGCTTCCTCGTGCTT (15B9-2B1 390 pb alelo mutado, 16B5-15B9 240 pb alelo silvestre).

K-Ras^{FSFG12V}; 3'ex1 CTCAGTCATTTTCAGCAGGC, STOP TAGTGCCTTGACTAGAGATCA, Kras2F-8B2 CCACAGGGTATAGCGTACTATGCAG (STOP-3'ex1 507 pb alelo mutado, 8B2-3'ex1 350bp alelo silvestre).

B-Raf; BRaf1 GCATAGCGCATATGCTCACA, BRaf 2 CCATGCTCTAACTAGTGCTG (413 pb alelo condicional, 357 pb alelo silvestre).

c-Raf; Raf1F_32B9 CTGATTGCCCAACTGCCATAA, Raf1R_33B1 ACTGATCTGGAGCACAGCAAT (195 pb alelo condicional, 145 pb alelo silvestre).

Mek1; Mek1l TCAATTAGGAGCCTGAATGGGTA; Mek1r CTTTCTGCACTTGACAAATGTATGG (390 pb alelo condicional, 270 pb alelo silvestre).

Mek2; Map2k2F_33B8 TGGCTCTTGACAGAAGTGGTTC, Map2k2R_33B9 CTTACCGCAATGCTGACCTTC, pPNTf_2B5 CCAGCTCATTCCTCCCACTCA (33B8-2B5 460 pb alelo *null*, 33B8-33B9 265 pb alelo silvestre).

Erk1; Erk1-3661 CCAATCTGCTTATCAACACCACCTGC, Erk1-3993 ACATGGGAACTCTCCTACCTTG, Erk1-neo CTACCGGTGGATGTGGAATGT (3993-neo 450 pb alelo *null*, 3993-3661 345 pb alelo silvestre).

Erk2; Erk2-1590 ACACAGTATGAGTCTCATTCC, Erk2-1870 GAACTTACTATGCACATCAGG (432 pb alelo condicional, 295 pb alelo silvestre).

RERT; Polr2aR_10B6 CCTCTCTGAGCCTCAATTAAGCAG, ESRF1f_10B7 TGAGTAACAAAGGCATGGAGCA, Polr2aF_14B5 CCAGATGACAGCGATGAGGA (14B5-10B6 480pb alelo silvestre, 10B6-10B7 390pb alelo *knock in*).

El protocolo de PCR era: 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación 60°C durante 30 segundos y polimerización a 72°C durante 1 minuto) y finalmente 10 minutos de elongación a 72°C. La electroforesis se hacía en geles de agarosa al 2%.

Alternativamente las líneas fueron genotipadas por Transnetyx (Córdoba, TN, EE.UU).

5.2 Procedimientos con animales

5.2.1 Generación de adeno-Cre y adeno-Flipasa.

5.2.1.1. Generación del adenovirus y concentración en un gradiente de CsCl

Se infectaban, con el adenovirus correspondiente, 64 placas (15cm) de células 293-A al 90% de confluencia (para cada stock viral, utilizado en una sola línea). Una cantidad de 6×10^{10} pfu era suficiente para infectar todas las placas. Pasados 3-4 días se recogía el sobrenadante donde debían encontrarse prácticamente todas las células muertas a consecuencia de la infección. El sobrenadante era centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos y los pellets eran congelados a -80°C.

Se resuspendían los pellets en TrisHCl (0.1M pH8) de tal forma que al final quedaban dos tubos con 15 ml. Se añadía 1.5ml de Deoxicolato sódico 5% (30 minutos a RT, tras mezclar bien), 150µl de $MgCl_2$ 2M y 50µl DNAasa (Roche) (30-60 minutos a 37°C tras mezclar bien, agitando cada 15 minutos).

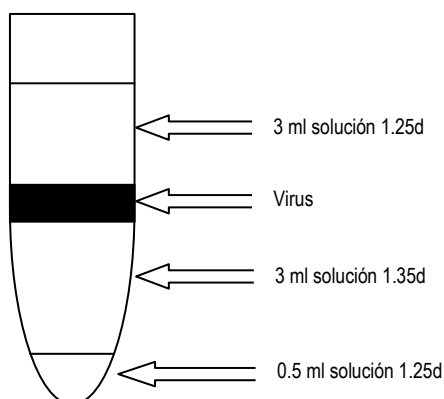


Figura 8. Gradiente de densidad de CsCl. La preparación de las distintas soluciones es indicada en la Tabla1.

El resultante se centrifugaba 15 minutos a 4°C y 4000rpm. En este período, se preparaba el gradiente de CsCl (**Figura 8**) en 6 tubos *ultra-clear* (Beckman Instruments). Una vez preparado, se añadían 5 ml del sobrenadante con el virus en cada tubo y se equilibraban en una balanza de precisión. Se ultracentrifugaba durante 1h a 10°C y 35000rpm con un rotor *SW40* (aceleración 1; deceleración 9). Pasado este tiempo se perforaba el tubo, en su parte inferior, dejando salir el contenido y recogiendo solo el volumen de la banda viral. Este contenido se mezclaba, en 6 nuevos tubos, con CsCl 1.35d y se

realizaba una segunda ultracentrifugación (16-24h a 10°C y 35000rpm).

5. Material y Métodos

El siguiente día, se recogía la banda viral en el menor volumen posible y este se introducía, mediante una aguja 18G, en un casete de diálisis (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette*, 10000 MWCO, *Pierce*).

Se dializó durante 24h en TrisHCl (10mM, pH=8) a 4°C, cambiando el tampón cada 8h. Al día siguiente se recogió el virus, se añadió glicerol a una dilución final del 10% y se hacían alícuotas. El virus se conservaba hasta su uso a -80°C.

Alternativamente los adenovirus se obtuvieron de la Universidad de Iowa (Iowa City, Iowa, EE.UU.)

	CsCl	TrisHCl 10mM pH8
1.25d	54.00g	146.00g
1.35d	70.40g	129.60g
1.50d	90.80g	109.29g

Tabla 1. Preparación de las soluciones de CsCl de diferente densidad.

5.2.1.2 Titulación del adenovirus

Para la titulación de las muestras se sembraban, por duplicado, placas de 96 pocillos, con 10000 células 293A/100µl por pocillo (DMEM +10% FBS).

Se hacía un banco de diluciones (por duplicado) a partir de la solución viral descongelada. En el primer tubo se añadían 10µl de la solución viral a 990µl de DMEM (10%FBS). A partir de esta dilución 10^{-2} se hacían el resto de las diluciones pasando 200µl a tubos con 1,8 ml de DMEM (10%FBS). Se sembraron 100µl de las diluciones 10^{-6} a 10^{-13} , una fila por cada dilución, dejando las dos últimas columnas como controles sin infectar. Las células se incubaban durante 15 días, a las condiciones de temperatura y CO₂ normales. Pasado ese tiempo se contaban el número de pocillos, por dilución, que mostraban CPE (*Cytopathic Effect*).

Para calcular el título se empleó el método de *Kärber*, $TCID_{50}=10^{1+d(S-0.5)}$, donde: **d**, log₁₀ del factor de dilución, en este caso siempre es 1; **S**, es la suma de los porcentajes de pocillos CPE positivos obtenidos para cada dilución (para cada dilución hay un máximo de 1 y un mínimo de 0). La $TCID_{50}/ml=10^{TCID_{50}+1}$ y la $PFU/ml=10^{TCID_{50}/ml-0.7}$ (este último es el método más habitual para expresar el título del virus).

5.2.2 Inoculación adenoviral

Se trataban animales de 8 semanas de edad, con una sola inoculación de 30µl de una solución de adenovirus (2.5×10^8 pfu/ratón para adeno-Cre, 6×10^7 pfu/ratón para adeno-Flipasa). El animal era previamente anestesiado mediante inyección intraperitoneal de una solución de ketamina (75mg/kg, *Imalgene*) y xilacina (12 mg/kg, *Rompum*). La solución viral era introducida directamente en la tráquea del animal mediante una cánula (Simpson et al., 2001). Tras el procedimiento los animales se mantenían 10-15 minutos bajo una lámpara de calor.

5.2.3 Tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT)

El 4-OHT tiene una estructura de tipo esteroídica por lo que únicamente es soluble en disolventes orgánicos (acetona, etanol, cloroformo....). Estos medios no pueden ser empleados como vehículos en la administración intraperitoneal del compuesto debido a los importantes efectos tóxicos que desencadenan. Así, para la administración del 4-OHT (*Sigma*) recurrimos a una suspensión del mismo en aceite de maíz. Para ello, se sonicaba la mezcla de ambos (2 pulsos de 1 minuto a un 30% de amplitud), en hielo (para evitar la inactivación del compuesto por calor). Esta preparación es de carácter inestable, por lo que tiene que ser administrada con rapidez y cada vez que quiera reusarse debe ser sonicada de nuevo.

Los tratamientos que se hicieron con 4-OHT constaban de una sola inyección intraperitoneal de 0,5 mg.

5.2.4 Tratamiento de tamoxifeno en la dieta

Se eligió tamoxifeno administrado en la dieta *ad libitum* (*Tekland CRD Tam⁴⁰⁰/CreER*) para aquellos tratamientos largos que tenían como objetivo la escisión de genes. La administración continuada de inyecciones intraperitoneales habría supuesto un estrés innecesario para el animal. El pienso que normalmente se empleaba en la alimentación (*2018S, Tekland*) contiene genesteína (una isoflavona encontrada normalmente en piensos que contienen soja). Este compuesto competiría con el tamoxifeno, por lo que 10 días antes de la administración de la dieta con tamoxifeno, se sustituía el pienso habitual por uno de aclaramiento (*2019S, Tekland*) sin genesteína, para asegurarnos de que los animales la eliminaran completamente. El metabolito activo del tamoxifeno, 4-OHT, se produce por hidroxilación en el propio organismo.

5.2.5 Tomografía Axial Computerizada (CT)

Los animales fueron anestesiados con un flujo continuo de una mezcla de 1% a 3% isoflurano/oxígeno (2 l/min). El área del pecho fue visualizada con el escáner *GE eXplore Locus micro-CT (GE Healthcare)*. La resolución isotrópica de este aparato es de 45 μm . La adquisición de imágenes con el micro-CT consistió en 400 proyecciones tomadas en una rotación completa del *gantry* (10min). La adquisición se hizo sin sincronización respiratoria. Las condiciones del tubo de rayos X fueron de 80kV de energía y 450 μA de corriente. Los datos resultantes fueron reconstruidos a una imagen final de volumen 875x875x465 cortes con un tamaño de voxel de 93 μm^3 . Las imágenes reconstruidas fueron vistas y analizadas con *MicroView analysis software (GE Healthcare)*.

5. Material y Métodos

5.3 Histopatología e Inmunohistoquímica

5.3.1 Histopatología

Los animales fueron sacrificados mediante CO₂. Las muestras eran fijadas siguiendo distintos procedimientos dependiendo de su procesamiento posterior (ver a continuación para cada procedimiento). Las muestras destinadas a tinciones, Hematoxilina/Eosina (H&E) e Inmunohistoquímica, fueron fijadas en formalina al 10% durante una noche.

5.3.2 Tinción X-gal *whole mount* y recuento de tumores

Las muestras de pulmón destinadas a recuento de tumores eran teñidas mediante la técnica X-gal *whole mount*. Para ello los pulmones eran fijados en una solución que mantenía la actividad enzimática de la β -galactosidasa. El contenido de esta solución era: 0.2% glutaraldehído, 3.75% formalina, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA y 0.1M tampón fosfato sódico (90-120 minutos de fijación). Posteriormente, las muestras eran lavadas en una solución que contenía: 0.2% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico, 2mM MgCl₂, 100mM tampón fosfato sódico pH 7.3 (1 lavado para quitar el exceso de fijador y 1 lavado durante toda la noche en agitación). Las muestras eran teñidas durante 48h (37°C, en agitación y en oscuridad) en una solución con: 5mM K₃Fe (CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 1mg/ml X-gal y un 95% de solución de lavado. Transcurrido ese tiempo eran lavadas 3 veces (10 minutos en agitación) en PBS y fijados en formalina al 10% durante una noche. Tras 1 lavado en PBS, las muestras eran deshidratadas progresivamente en etanol 50% (1h), etanol 70% (mínimo 1h, pudiendo permanecer toda la noche), etanol 95% (1h) y etanol 100% (1h).

Previo a embeber las muestras en parafina se hacía un paso de dos lavados en isopropanol (1h cada uno, el segundo a 60°C) y a continuación en una mezcla 1:1 isopropanol-parafina (1h mínimo, pero pueden estar 1 noche, 60°C). Finalmente las muestras eran embebidas en parafina (3 veces, 1h). Cortes estándar de 4µm eran contrateñidos con *Nuclear Fast Red*.

Para el recuento del número de tumores se tomaban 3 cortes, espaciadas cada una de ellas por 50 cortes seriados. El grado de los tumores se estableció según los criterios marcados en la clasificación creada en el laboratorio de Tyler Jacks (Jackson et al., 2005).

5.3.3 Tinción X-gal en cortes de criostato

Las muestras de pulmón destinadas a recuentos de células β -gal positivas a tiempos tempranos eran teñidas siguiendo este procedimiento. Una vez obtenida la muestra se embebía en OCT (*Tissue Tek*, *Sakura*), previo paso a ser congeladas en nieve carbónica y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Cortes de 10µm se hacían en el criostato (*Vacutomer*, *Dako*). Se sumergían estos criocortes en una solución fijadora (0.2% glutaraldehído, 2mM MgCl₂, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato)

durante 10 minutos. Posteriormente se realizaban 3 lavados, de 10 min, en una solución compuesta por: 0.1M tampón fosfato pH7.2, 2mM MgCl₂, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico. Después se incubaban a 37°C durante 24h en la solución de tinción (tampón fosfato 0.1M pH7.2, 2mM MgCl₂, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆ y 1mg/ml X-gal).

Una vez teñidos los criocortes se realizaban 3 lavados, de 10 minutos cada uno, en PBS y finalmente se contrateñían con *Nuclear Fast Red*.

5.3.4 Tinción β -galactosidasa Asociada a Senescencia (SA- β -gal)

Los criocortes se obtenían de la misma forma que en la sección anterior (5.3.3). Para la tinción se usaba el kit *SA- β -gal staining (Cell Signalling)*. Los cortes eran lavados con PBS y a continuación sumergidos en solución de fijación durante 10-15 minutos. Posteriormente eran lavados 2 veces en PBS, previo paso a ser sumergidos durante 24h en solución de tinción (930 μ l solución de tinción, 10 μ l solución A, 10 μ l solución B, 50 μ l 20mg/ml X-gal en dimetil formamida). Se seguía la aparición del color azul por microscopio. Finalmente, los cortes se contrateñían con *Nuclear Fast Red* y se montaban para su posterior conservación.

5.3.5 Inmunohistoquímica

La detección por inmunohistoquímica se realizaba sobre secciones que se obtenían de pulmones fijados en formalina al 10% y posteriormente embebidos en parafina. Inicialmente se desparafinaban y eran sometidos a una recuperación antigénica con citrato sódico 10mM pH 6, a 95°C durante 20minutos. A continuación, se trataban con peróxido de hidrógeno (diluido al 3% en metanol), para eliminar la actividad de peroxidasa endógena del tejido. Posteriormente se incubaban con el anticuerpo primario correspondiente y luego con el secundario biotinilado. Finalmente, las muestras se incubaban con la mezcla ABC de Vectastain (Elite) y se revelaban con diaminobencidina. Se contrateñían con hematoxilina, se deshidrataban y se montaban para su posterior conservación.

Los anticuerpos primarios usados eran: B-Raf (Abcam, ab33899), pErk (Cell Signalling, 9101), pCofilin (Santa Cruz, sc-21867-R) y Caspasa 3 activa (R&D Systems, AF835).

5.4 Análisis de proteínas

5.4.1 Extracción y cuantificación de proteínas de tejidos y tumores

Los tejidos eran congelados en nieve carbónica inmediatamente después de su extracción y conservados a -80°C. La extracción de proteínas se hacía en un tampón de lisis que contenía: 50mM TrisHCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, inhibidores de proteasas (*cocktail de inhibidores, Complete*

5. Material y Métodos

Mini, Roche) y de fosfatasa (Ortovanadato sódico 100mM y NaF 1mM). Como sistema de homogeneización se empleó el Precellys24 (Precellys). Una vez el tejido era disgregado, se dejaba actuar al tampón de lisis durante 20 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugaba durante 15 min a 13000rpm y 4°C. El sobrenadante era conservado a -80 °C.

Para la cuantificación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de BSA y se empleaba el método Bradford (Bio-Rad DC Protein Assay).

5.4.2 Electroforesis e Inmunoblot

Usualmente se empleaban entre 30-40 µg de extracto de proteínas, mezclados con el tampón de carga (XT simple buffer, Bio Rad) y el tampón reductor (XT reducing agent, Bio Rad, para eliminar puentes disulfuro). La mezcla era calentada a 95°C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas.

Anticuerpo	Compañía	Dilución
A-Raf	Abcam (ab19880)	1/200
B-Raf	Santa Cruz(sc-5284)	1/500
c-Raf	BD Biosciences (610151)	1/500
Erk1/2	Santa Cruz (sc-93)	1/500
p-Erk	Cell Signalling (9101)	1/500
Mek1	Santa Cruz (sc-219)	1/500
Mek2	BD Biosciences (610235)	1/500
p-Mek	Cell Signalling (9154)	1/500
RSK-1	Santa Cruz (sc-231)	1/500
p-p90RSK	Cell Signalling (9341)	1/150
Gapdh	Sigma (G8795)	1/15000

La electroforesis (SDS-PAGE) se realizaba en geles de poliacrilamida 4-12% Bis-Tris (Criterion XT Precast Gel, Bio Rad).

La transferencia sobre membranas de nitrocelulosa (Bio Rad) se hacía en sistema semiseco y el bloqueo en una solución de leche al 5% en TBS (mínimo 30 minutos a RT/ toda la noche a 4°C). Posteriormente las membranas eran incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2), diluido en una solución de BSA al 5% en TBS-Tween (0.1%), durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados en TBS-Tween (0.1%), eran incubados con el correspondiente anticuerpo secundario (Alexa Fluor 680, Invitrogen/ Alexa Fluor 800, Invitrogen) durante 1h a temperatura ambiente y se revelaban con el escáner

Tabla 2. Anticuerpos usados en western blot.

Odyssey (Licor Biosciences).

5.5 Southern Blot

5.5.1 Extracción de DNA procedente de tejidos

De la misma forma que se hacía para las proteínas, los tejidos eran congelados en nieve carbónica y conservados a -80°C. El tampón que se usaba en la lisis del tejido, era el mismo que el descrito para la digestión de las colas en el genotipaje (sección 5.1.1). Antes de incubar durante toda la

noche a 55°C, se disgregaban los tejidos empleando el sistema de homogeneización *Precellys24* (*Precellys*), en el tampón mencionado con anterioridad.

El método de extracción de DNA, para este procedimiento, era el fenol/cloroformo. Primero se añadía un volumen de fenol (500µl) y tras agitar bien se centrifugaba la muestra (5 minutos, 13000rpm y 4°C). La fase acuosa se transfería a un nuevo tubo, se agregaba 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) se agitaba bien y se centrifugaba (5 minutos, 13000 rpm y 4°C). Nuevamente la fase acuosa se transfería a otro tubo y se mezclaba bien con 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). (5 minutos, 13000 rpm y 4°C). La fase acuosa, en un nuevo tubo, se mezclaba con isopropanol en una proporción 1:1, para precipitar el DNA (5 minutos) y la mezcla se centrifugaba (10 minutos, 13000 rpm y 4°C). El pellet resultante se lavaba con etanol al 70%. Para el secado del pellet se procedía igual que en la sección 5.1.1. El DNA se resuspendía en 50µl de tampón TE. La concentración de DNA se medía en el *NanoDrop* (*NanoDrop*).

5.5.2 Digestión del DNA

Idealmente se digerían 30µg de DNA (esto debía suponer un volumen máximo de 41µl), pero si el DNA se encontraba bastante diluido se podía digerir algo menos. El volumen era un factor limitante porque toda la mezcla de digestión se debía añadir, posteriormente, en el pocillo del gel de

Locus	Enzima de restricción	Fragmentos detectados
B-Raf	HindIII	2,5kb lox/ 1,2kb null
c-Raf	PstI	3,1kb lox/ 3,5kb null
Mek1	HindIII	1,5kb lox/ 1,7kb null
Erk2	KpnI	4,7kb lox/ 2,8kb null

Tabla 3. Enzimas usadas y fragmentos generados en la digestión del southern blot.

electroforesis, por tanto no debía suponer más de un total de 60µl. La mezcla constaba de: DNA, la enzima correspondiente (**Tabla 3**) (alrededor del 10% de la mezcla, usualmente 5µl), el tampón indicado para la enzima 1X, BSA 1X (0.4mg/ml), espermidina de salmón (0.9mM), 1µl de RNasa/DNasa free (*Roche*) y se completaba con agua. La digestión se incubaba a 37°C durante una noche.

5.5.3 Electroforesis y Transferencia

La electroforesis se hacía en geles de agarosa al 0.8%. Una vez comprobado que el DNA se había digerido correctamente se procedía al tratamiento del gel para su posterior transferencia: Lavado con agua destilada. Despurinización; 15 minutos (agitación) en HCl 0,25N (especialmente requerido para fragmentos de más de 3kb). Desnaturalización; se lavaba el gel con agua destilada y se sumergía el gel una solución 0.5M NaOH y 1.5M NaCl (20 minutos en agitación). Neutralización; como cada paso precedido de un lavado en agua destilada, y en esta ocasión sumergido, en agitación, en una solución 0.5M TrisHCl y 1.5M NaCl (30 minutos). Equilibrado; tras lavar con agua destilada, el gel se agitaba en la

5. Material y Métodos

solución en la que se produciría la transferencia, SSC10x (mínimo de 30 minutos). La transferencia se realizaba sobre una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) durante toda la noche. Al día siguiente el DNA se unía covalentemente a la membrana empleando 1.5μjulios de radiación UV (*Stratalinker*, Stratagene). Una vez hecho esto la membrana se podía guardar o continuar directamente con el *Southern*.

5.5.4 Hibridación de la sonda y revelado

Si la membrana se había secado, se humedecía previamente en SSC 2x. Posteriormente, se ponía en un tubo dentro del horno de hibridación con tampón de hibridación a 42°C. Este proceso de prehibridación se hacía durante unas 4 horas, y tenía el objeto de bloquear uniones inespecíficas.

Se marcaban 25ng de sonda, cuyo volumen se completaba hasta 45μl con tampón TE. El proceso de marcado requería de: Desnaturalización de la sonda; hirviéndola en un baño a 100°C (5 minutos) y después en hielo para evitar la renaturalización (5 minutos). Marcaje de la sonda; para ello la sonda se añadía al kit *Rediprime Random Prime Labelling system* (Amersham) y 5μl de α³²P-dCTP, se mezclaba bien y se dejaba durante 30 minutos a 37°C, para que se polimerizara la sonda marcada. Purificación de la sonda; este paso eliminaba el exceso de radiactividad usando columnas *G-50 Microcolumns Radiolabeled Probe Purification Kit* (Amersham).

Una vez se tenía la sonda marcada, se añadían 5μl de NaOH 5N (desnaturalización química), además de la sonda del marcador de pesos moleculares. Al tubo que contenía la membrana y 10 ml de tampón de hibridación nuevo, se añadía la mezcla de la sonda marcada radiactivamente y se dejaba hibridar durante toda la noche en el horno a 42°C.

Al día siguiente, tras descartar la solución de hibridación con la sonda marcada, se realizaban los sucesivos lavados para eliminar el exceso de radiactividad (20 minutos SSC2x+0.1% SDS, 20 minutos SSC1x+0.1%SDS y 20 minutos SSC 0.1X+0.1% SDS), siempre a 42°C. La membrana era expuesta durante 24h ante una pantalla de *Phosphorimager*, y revelada transcurrido ese tiempo.

5.6 Cultivos celulares

Los MEFs eran generados, en todo caso, a partir de embriones obtenidos de hembras sacrificadas a día 13.5 *post-coitum*.

5.6.1 Curvas de proliferación

Los MEFs eran descongelados en DMEM suplementado con 10% FBS y 600nM de 4-OHT (*sigma*) (disuelto en etanol absoluto) y se cultivaban en este medio durante 5 días para lograr la activación de la expresión de K-Ras^{G12V} y la escisión de los genes correspondientes. Transcurrido ese tiempo se recogían células para hacer un *western blot* (mismo procedimiento que para tejidos, pero sin

homogeneización) y comprobar la escisión. Al mismo tiempo, se sembraba la curva de crecimiento. Se hacía en placas de 96 pocillos, 1000 células por pocillo y por cuadruplicado. Durante la curva de crecimiento las células se mantenían en el mismo medio (DMEM+10%FBS+600nM 4-OHT). El número de células se estimaba con un método indirecto, la reducción del reactivo MTT por deshidrogenasas mitocondriales (*Roche*), y la proliferación era referida como el incremento en la absorbancia a 590 nm respecto al día 0.

Para la curva de proliferación al 2% de FBS, las células se descongelaban igualmente en DMEM suplementado con 10%FBS y 600nM 4-OHT. 2 días antes de la siembra de la curva, las células se lavaban dos veces con PBS y se sustituía por DMEM+2%FBS+4-OHT. Este medio se mantenía durante todo el experimento.

5.6.2 Inmortalización

Las células se descongelaban en el mismo medio empleado para la curva de proliferación y también se mantenían en el mismo medio durante todo el experimento. Se sembraban 5×10^5 tres días después de iniciarse el tratamiento con 4-OHT y posteriormente las células se pasaban, siguiendo el clásico protocolo 3T3, hasta que superaban el estado de senescencia replicativa.

5.7 Cálculos estadísticos

Los cálculos estadísticos que aparecen en la memoria fueron realizados empleando el test t-Student, de dos colas. La igualdad o diferencia de las varianzas fue determinada por la prueba F-Fischer. Todo ello fue realizado con el programa Excel (*Microsoft*).

6. *Resultados*

6.1 La eliminación de Erk1 o Erk2 no previene el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V}

Se ha demostrado que Erk2 es esencial para la embriogénesis del ratón. Así, los animales *Erk2*^{-/-} mueren entre los días E6.5 y E11.5, dependiendo del fondo genético, debido a problemas severos en el desarrollo de la placenta (Hatano et al., 2003; Saba-El-Leil et al., 2003; Yao et al., 2003). Sin embargo, Erk1 es prescindible para el desarrollo embrionario, siendo los ratones *Erk1*^{-/-} viables, sin ningún fenotipo severo y fértiles (Pages et al., 1999). Se quiso ver si esta diferencia funcional entre ambas isoformas se daba también en el desarrollo de tumores inducidos por K-Ras^{G12V}. Para ello se cruzaron los ratones *K-Ras*^{+/LSLG12V^{geo} (Guerra et al., 2003) con las líneas mutantes *Erk1*^{-/-} (Pages et al., 1999) o *Erk2*^{lox/lox} (Fischer et al., 2005).}

Estos animales, y sus controles *K-Ras*^{+/LSLG12V^{geo} (designados de ahora en adelante simplemente como *K-Ras*^{+/LSLG12V}), fueron inoculados en la 8ª semana de vida, por vía traqueal, con adenovirus que portaban el gen de la recombinasa Cre. Al infectarse las células del epitelio pulmonar, y la consecuente expresión de la Cre, se indujo la recombinación entre los dos sitios *loxP* que flanqueaban el casete STOP de transcripción, el cual impedía la expresión del alelo *K-Ras*^{G12V}, con la consiguiente eliminación del mencionado casete. Además, en los animales *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk2*^{lox/lox} a la vez que la Cre inducía la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}, actuaba sobre dos sitios *loxP* que flanqueaban el exón 3 del locus de *Erk2*, eliminándolo y anulando la expresión de Erk2. Así se conseguía la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} en ausencia de Erk1 (eliminado en línea germinal) o de Erk2.}

Se trataron 14 ratones *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk1*^{-/-} y 17 controles *K-Ras*^{+/LSLG12V}. Pasadas las 30 semanas de vida (22 semanas después del tratamiento) tuvieron que ser sacrificados animales en ambos grupos, debido a los problemas respiratorios originados por el desarrollo de tumores de pulmón (**Figura 9**). Fijando la *t*₅₀ (tiempo en el cual el 50% de los animales ha muerto) como referencia, esta era de 40 semanas para los controles, mientras que los *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk1*^{-/-} morían ligeramente más tarde, a las 46,3 semanas. Tomando como 100% la supervivencia de los controles, los animales sin Erk1 vivían casi un 20% más (teniendo en cuenta que los animales fueron tratados a las 8 semanas de vida, es decir 32 semanas de los controles frente a 38,3). En el caso de los animales *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk2*^{lox/lox} los resultados fueron similares (**Figura 9**). Éstos (n=32) tenían una *t*₅₀ de 34,9 semanas mientras que los controles *K-Ras*^{+/LSLG12V} (n=19) alcanzaban este punto un poco antes, a las 31,2 semanas (23.2 vs 26.9, un 16 % más de vida sin Erk2). La diferencia observada entre la *t*₅₀ de ambos experimentos es explicada por la utilización de un stock de adenovirus específico para cada línea y sus controles. Los incrementos de supervivencia observados cuando los tumores crecían en ausencia de Erk1 o de Erk2, no parecía indicar que la ausencia de una sola proteína afectara al número o malignidad de los tumores.

6. Resultados

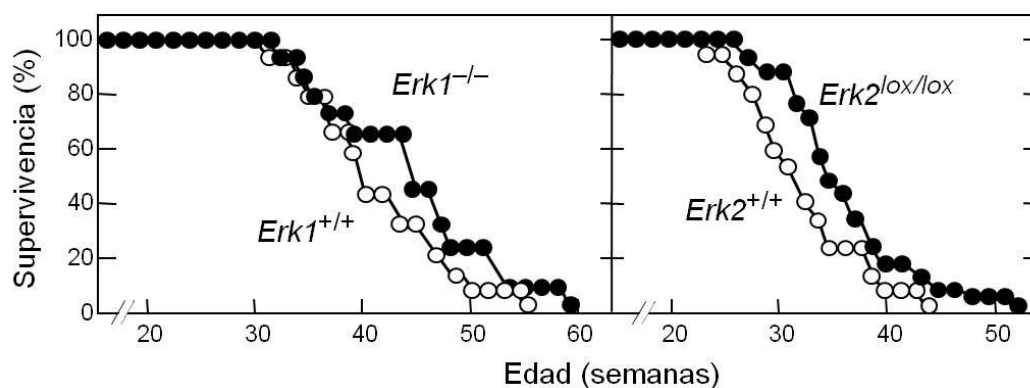


Figura 9. La ausencia de Erk1 o Erk2, en tumores inducidos por K-Ras^{G12V}, no implica un notable incremento de la esperanza de vida. Curva de supervivencia. Los animales fueron inoculados con adeno-Cre, en la 8ª semana de vida, a través de una cánula en la tráquea. Eje Y, porcentaje de animales vivos. Eje X, semanas de vida de los animales. **Panel izquierdo.** Círculos negros *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-}* (n=14), círculos blancos *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{+/+}* (n=17). **Panel derecho.** Círculos negros *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk2^{lox/lox}* (n=32), círculos blancos *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk2^{+/+}* (n=19).

Esto último fue comprobado cuando unos animales *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-}* (n=5) fueron sacrificados con sus correspondientes controles (n=5), 6 meses después de la infección, y se analizó la carga tumoral (**Figura 10**). Para este parámetro se tuvo en cuenta tanto el número de tumores como el grado de malignidad de los mismos (Jackson et al., 2005). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, ni en el número de tumores, ni en el grado de malignidad de los mismos, lo que explicaba el por qué la tasa de mortalidad era parecida. Similares resultados se obtuvieron tras analizar animales *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk2^{lox/lox}* (n=5) y sus controles (n=5) (**Figura 10**).

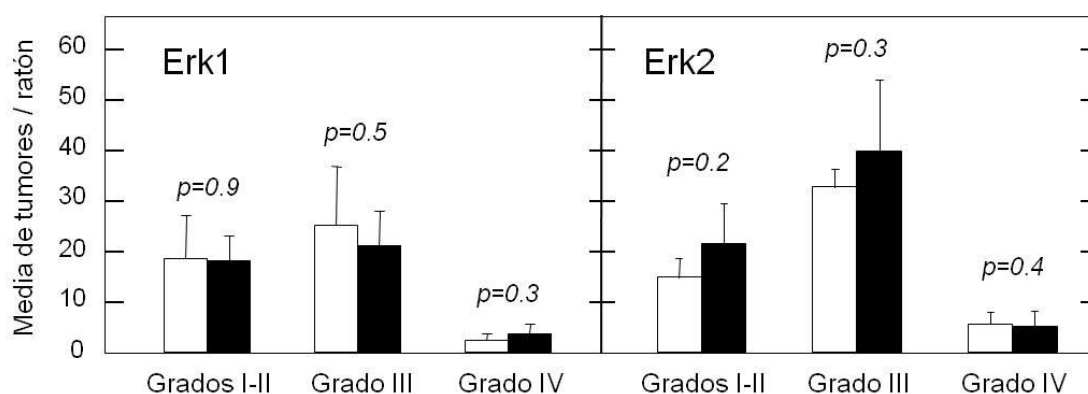


Figura 10. La ausencia de Erk1 o Erk2 no disminuye la carga tumoral inducida por la expresión del oncogén K-Ras^{G12V}. Número medio de tumores por ratón clasificados según el grado de malignidad (I-IV). Los animales fueron sacrificados 6 meses después de la infección. Las barras de error indican la desviación estándar. El p valor fue calculado mediante un análisis t de Student. **Panel izquierdo.** Barras blancas *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{+/+}* (n=5), Barras negras *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-}* (n=5). **Panel derecho.** Barras blancas *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk2^{+/+}* (n=5), Barras negras *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk2^{lox/lox}* (n=5).

De todo ello se concluía que la ausencia de una sola quinasa Erk no afecta al desarrollo de adenomas y adenocarcinomas, inducidos por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}.

Para confirmar este resultado se quiso comprobar si Erk1 o Erk2 no se encontraban presentes en los tumores. Para ello, se procedió al análisis de tumores de pulmón aislados de ratones sacrificados 8 meses después de la infección adenoviral. Se observó, mediante un análisis del DNA genómico, que en tumores aislados de animales *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk2*^{lox/lox} (n=4) había un 100% de recombinación del alelo *Erk2*^{lox} (**Figura 11**). Así, cuando se hizo el análisis a nivel de proteína de 3 tumores diferentes a los anteriores, estos no expresaban Erk2 (**Figura 12**). Como era de esperar, puesto que era un *knock out* en línea germinal, los tumores de ratones *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk1*^{-/-} no expresaban la proteína Erk1 (**Figura 12**).

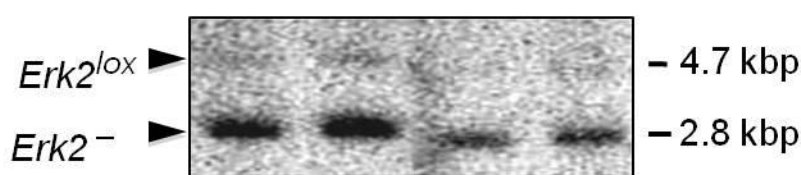


Figura 11. Escisión efectiva de *Erk2*^{lox} en tumores inducidos por la expresión de *K-Ras*^{G12V}. *Southern blot*. El DNA fue extraído de tumores aislados de ratones *K-Ras*^{+/LSLG12V};*Erk2*^{lox/lox}. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de la infección con adeno-Cre. La digestión del DNA fue realizada con KpnI. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *Erk2*^{lox} y *Erk2*⁻ aparecen en la figura.

El análisis bioquímico de estos tumores, tanto los que se desarrollaron en ausencia de Erk1, como de aquellos que lo hicieron en ausencia de Erk2, reveló que no existían alteraciones en la señalización de la vía, teniendo en cuenta que los niveles de fosforilación de p90RSK, un conocido efector de la vía, se encontraban inalterados (**Figura 12**).

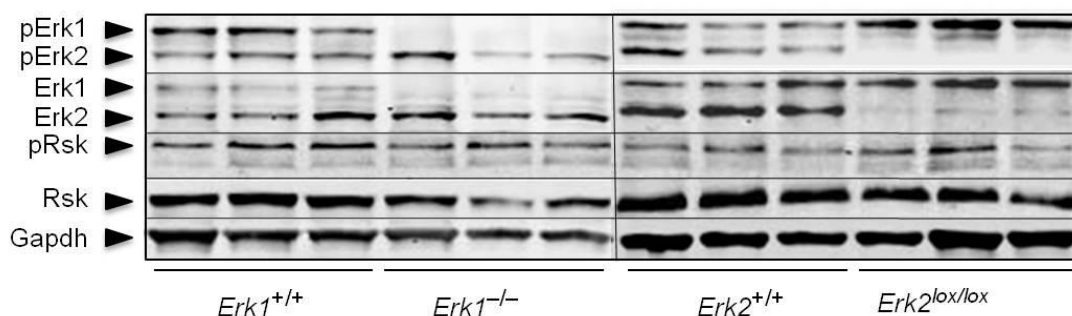


Figura 12. Ausencia de las proteínas Erk1 o Erk2 en los tumores inducidos por la expresión de *K-Ras*^{G12V}, y análisis del estado de la vía en los mismos. *Western blot* frente a pErk1/2, Erk1/2, pRsk y Rsk, a partir de lisados de tumores de pulmón individualizados. Los tumores fueron aislados de diferentes ratones sacrificados a los 8 meses de haber sido inoculados con adeno-Cre. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha.

6. Resultados

Esto sugirió que en ausencia de Erk1, Erk2 puede mantener la señalización y viceversa. A su vez, se pudo observar que, mientras que en ausencia de Erk1 los niveles de pErk2 no cambiaban, los niveles de pErk1 se encontraban ligeramente elevados cuando Erk2 estaba ausente. Esto podría indicar que los niveles normales de pErk1 no pueden mantener la señalización de la vía cuando Erk2 está ausente. Convendría aumentar la n (número de tumores analizados) para poder ratificar esta afirmación.

6.2 La vía Erk-Mapk es esencial para el desarrollo de tumores inducidos por la expresión de K-Ras^{G12V}, pero también para la homeostasis del ratón

Hasta este momento se podía decir que en ausencia de una de las dos isoenzimas Erk, la otra podía mantener la señalización de la vía, pero no se había demostrado que dicha vía fuera esencial para el desarrollo de los tumores inducidos por el oncogén K-Ras^{G12V}. Con este objeto, se generó la línea K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox} cruzando las líneas *knock out* para cada una de las quinasas descritas en el apartado anterior.

Animales de 8 semanas de edad, K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox} (n=11), fueron inoculados con adenovirus que portaban el gen de la Cre. De esta forma, en un fondo en el que no había expresión de Erk1, la Cre eliminaría la expresión de Erk2 y al mismo tiempo induciría la expresión del oncogén K-Ras^{G12V}. Del mismo modo se procedió con controles K-Ras^{+/-LSLG12V} (n=14) de la misma edad. En este caso se vio que todos los animales K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox} seguían vivos a las 58 semanas, sin embargo, todos los controles habían muerto para ese tiempo (**Figura 13**). La t₅₀ de éstos últimos fue de 48 semanas, mientras que la de los K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox} fue de 63 semanas (40 vs 55 teniendo en cuenta que la infección se produjo en la 8ª semana de vida, prácticamente un 40% más de supervivencia). Esto parecía indicar que estos tumores necesitaban la actividad de la vía para iniciarse.

Así se comprobó cuando al analizar 10 ratones K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox}, frente a 7 controles, existían diferencias significativas en el número de tumores para los grados de malignidad II y III (**Figura 14**). Además, en los animales K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox} no se encontró ningún tumor de grado IV, el máximo grado de malignidad encontrado en los controles. Sin embargo, el crecimiento de los escasos tumores, que aun aparecían, provocaba finalmente su muerte. Cuando se analizaron algunos de estos escasos tumores que presentaban los ratones K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox} (sacrificados 8 meses después del tratamiento con adeno-Cre), se vio, mediante análisis de DNA, que en todos ellos (n=6) existía al menos un alelo Erk2^{lox} que no había recombinado (**Figura 15**). En los 4 tumores que se analizaron por *western blot* se comprobó que ninguno tenía Erk1, y sin embargo todos ellos tenían la isoforma Erk2 (**Figura 15**). Por tanto, se observó, mediante dos métodos distintos, que estos tumores procedían de células en las que la Cre había inducido la expresión del oncogén, pero había fallado en la

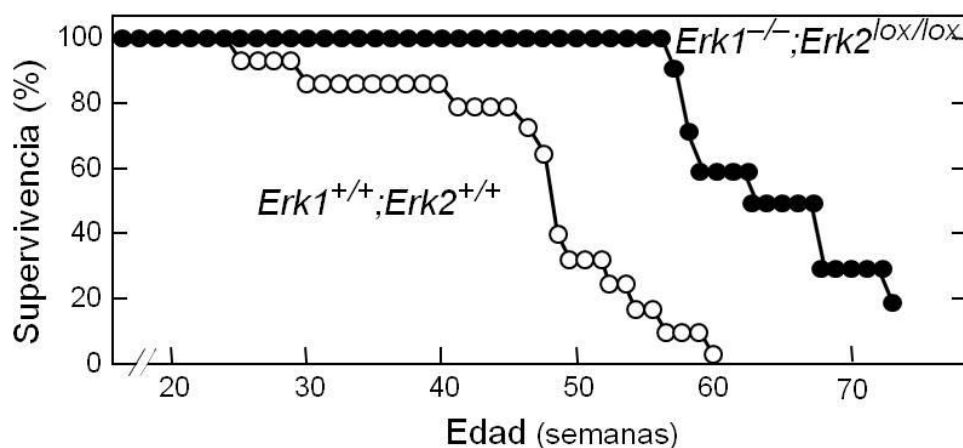


Figura 13. La ausencia de Erk1 y Erk2, en tumores inducidos por K-Ras^{G12V}, implica un notable incremento de la esperanza de vida. Curva de supervivencia. Los animales fueron inoculados con adeno-Cre, en la 8ª semana de vida, a través de una cánula en la tráquea. Eje Y, porcentaje de animales vivos. Eje X, semanas de vida de los animales. Círculos negros *K-Ras^{+/LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox}* (n=11), círculos blancos *K-Ras^{+/LSLG12V};Erk1^{+/+};Erk2^{+/+}* (n=14).

recombinación en al menos uno de los alelos *Erk2^{lox}*. Todo ello indica que la presencia de al menos una de las isoformas Erk, y por tanto la señalización de la vía, es necesaria y esencial para el desarrollo de tumores de pulmón inducidos a partir de la expresión de K-Ras^{G12V}

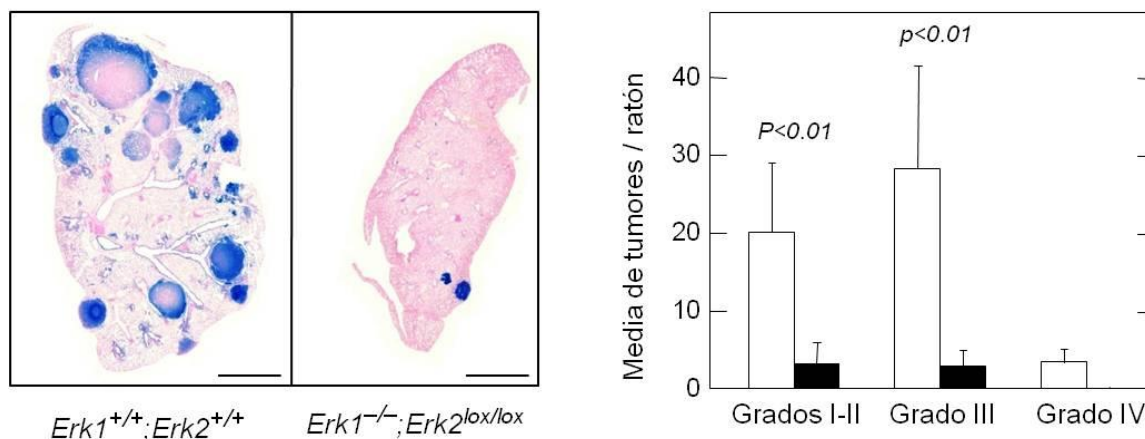


Figura 14. La ausencia de Erk1 y Erk2 provoca una disminución de la carga tumoral inducida por la expresión de K-Ras^{G12V}. **Panel izquierdo.** Tinción X-gal *whole mount* de lóbulos pulmonares. Los pulmones fueron extraídos de ratones sacrificados 6 meses después de la infección con adeno-Cre. Las células β -gal positivas (azules) expresaban K-Ras^{G12V}. Genotipos indicados en la figura. Barra de escala 5mm. **Panel derecho.** Número medio de tumores por ratón clasificados según el grado (I-IV). Las barras de error indican la desviación estándar. El p valor fue calculado mediante un análisis t de Student. Barras blancas *K-Ras^{+/LSLG12V};Erk1^{+/+};Erk2^{+/+}* (n=7), Barras negras *K-Ras^{+/LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox}* (n=10).

6. Resultados

La esencialidad que tiene Erk1/2 en el desarrollo de tumores, inducidos por formas oncogénicas de K-Ras, podría implicar que la ausencia de ambas isoformas afectara al mantenimiento de los mismos, y por tanto podrían ser una buena diana para el desarrollo de terapias antitumorales. Sin embargo, Erk1/2 ha mostrado ser muy importante en la proliferación celular, con lo que su eliminación podría provocar toxicidad en tejidos altamente proliferativos. Con el fin de analizar los posibles efectos tóxicos de un tratamiento con inhibidores de Erk, se decidió analizar, mediante una aproximación genética, el fenotipo de los animales en los que Erk era eliminado sistémicamente. Para ello se cruzaron los animales *Erk1^{-/-}; Erk2^{lox/lox}*, con la línea *RERT^{ert/ert}* (Guerra et al., 2003). En esta línea, la Cre se encuentra bajo el control del promotor de la RNA polimerasa II, y por tanto se expresa de una forma ubicua. Sin embargo, se encuentra en su forma inactiva, al encontrarse fusionada al receptor de estrógenos ERT2. En presencia de 4-OH-Tamoxifeno, la proteína de fusión Cre-ERT2 se transloca al núcleo y la Cre puede actuar sobre los sitios *loxP* que existan en el genoma del animal.

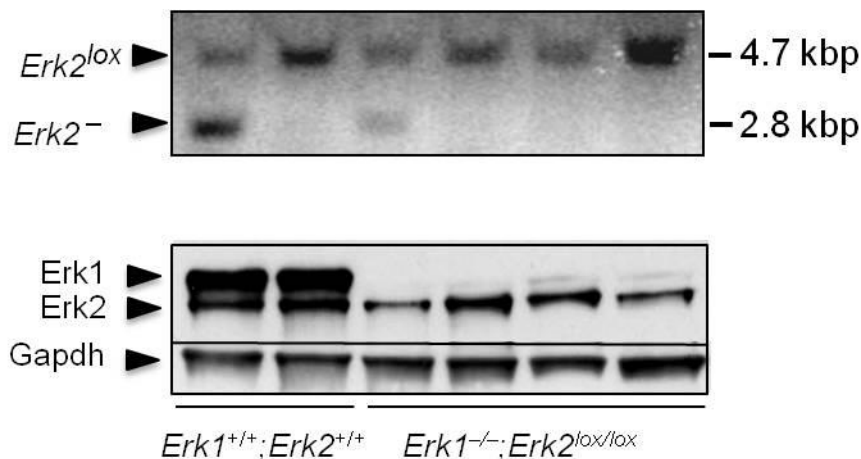


Figura 15. Erk2 es esencial para el desarrollo de los tumores inducidos por K-Ras^{G12V}, cuando Erk1 está ausente. Panel superior. Southern blot. El DNA fue extraído de tumores aislados de ratones *K-Ras^{+/LSLG12V};Erk1^{-/-}; Erk2^{lox/lox}*. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de la infección con adeno-Cre. La digestión de DNA fue realizada con KpnI. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *Erk2^{lox}* y *Erk2⁻* aparecen en la figura. **Panel inferior. Western blot** frente a Erk1/2 a partir de lisados de tumores de pulmón individualizados. Los tumores fueron aislados de diferentes ratones sacrificados a los 8 meses de haber sido inoculados con adeno-Cre. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha.

Así, 8 animales *Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*, y el mismo número de controles *Erk1^{+/+};Erk2^{+/+};RERT^{ert/ert}*, fueron alimentados *ad libitum* con un pienso que contenía tamoxifeno. Antes de cumplirse las tres semanas del inicio del tratamiento, todos los mutantes tuvieron que ser sacrificados (**Figura 16**) debido a que presentaban un estado caquéctico, habiendo perdido más del 20% de su peso, y todos ellos habían agotado las reservas energéticas de grasa blanca. Cuando los animales fueron analizados presentaban problemas en múltiples órganos, pudiendo ser la acumulación de todos esos

6. Resultados

pequeños defectos la causa de la muerte. Así por ejemplo, tenían cierta atrofia del bazo y algunas anomalías en el intestino delgado y el páncreas. También presentaban ulceraciones en la lengua, lo que podría dificultar la alimentación del animal, lo que unido a esos problemas intestinales, podría haber llevado a la muerte del animal. Cuando se realizó un estudio de la eliminación de *Erk2*, en diferentes tejidos de los animales sacrificados, se encontraron porcentajes de escisión que variaban entre un 40-60% dependiendo del tejido (**Figura 16**), pudiendo explicar esto la ausencia de un fenotipo marcado en los distintos tejidos analizados. Estos resultados manifiestan que la presencia de *Erk2* es esencial para la homeostasis del ratón adulto en ausencia de *Erk1*.

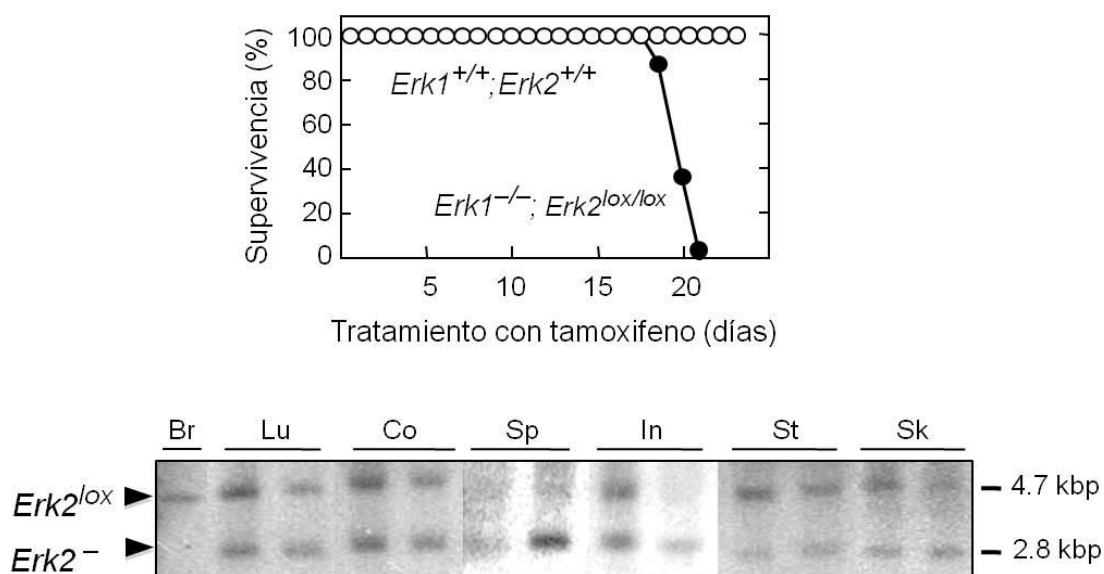


Figura 16. *Erk2* es esencial para la homeostasis del animal adulto en ausencia de *Erk1*. **Panel superior.** Curva de supervivencia. Animales de 30 días de edad fueron alimentados *ad libitum* con un pienso que contenía tamoxifeno. EjeY, porcentaje de animales vivos. EjeX, días después de iniciarse el tratamiento con tamoxifeno. Círculos blancos *Erk1^{+/+}; Erk2^{+/+}; RERT^{ert/ert}* (n=8). Círculos negros. *Erk1^{-/-}; Erk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* (n=8). **Panel inferior.** *Southern Blot*. El DNA se extrajo de diferentes tejidos obtenidos de animales *Erk1^{-/-}; Erk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*, los cuales habían sido alimentados *ad libitum* con pienso que contenía tamoxifeno. El tratamiento comenzó cuando los animales tenían 30 días de edad y éstos fueron sacrificados cuando perdieron más del 20% de su peso. La digestión del DNA fue realizada con KpnI. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *Erk2^{lox}* y *Erk2⁻*, aparece en la figura. Los distintos tejidos analizados fueron: Cerebro (Br), Pulmón (Lu), Colon (Co), Bazo (Sp), Intestino delgado (In), Estómago (St) y Piel de la espalda (Sk).

Por otro lado se vio que los animales *Erk1^{-/-}; Erk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* (n=3) y *Erk1^{+/+}; Erk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* (n=3) eran viables después de tres meses de alimentación con el pienso con tamoxifen. No se observó en ellos ningún tipo de anomalía morfológica o en la actividad. Por tanto, estos resultados preliminares indicarían que un solo alelo *Erk* es suficiente para mantener la homeostasis del ratón adulto.

6. Resultados

6.3 Los tumores de pulmón inducidos por la expresión de K-Ras^{G12V} pueden desarrollarse en ausencia de Mek1 o Mek2

Dado que la ausencia de una sola isoforma *Erk* no es suficiente para impedir el desarrollo de los tumores, y que la ausencia de ambas, aún siendo eficaz en este aspecto, es deletérea para la normal fisiología del ratón, se decidió buscar otras proteínas cuya ausencia afectara al desarrollo del tumor, sin afectar a la salud del animal. *Mek1*, al igual que *Erk2*, es esencial para el normal desarrollo embrionario del ratón, provocando su ausencia la muerte de los embriones a día E10.5, debido a problemas en la formación de la placenta (Bissonauth et al., 2006; Giroux et al., 1999). Al igual que ocurría para *Erk1*, *Mek2* es dispensable para el desarrollo embrionario, no presentando los animales ningún defecto al nacer y siendo completamente fértiles (Belanger et al., 2003). Por tanto, la situación de partida era igual que para las proteínas *Erk*, dos isoformas similares, con una diferente importancia durante el desarrollo embrionario. Esta diferencia también se ha visto en estudios de carcinogénesis epitelial inducida por el clásico protocolo DMBA-TPA, en los que la ausencia de *Mek1* en papilomas no puede ser compensada por *Mek2* (Scholl et al., 2009b). La cuestión a resolver era si en nuestro modelo habría esta diferencia de roles entre ambas isoformas, o si por el contrario habría una mutua compensación, como se ha mostrado para *Erk*.

Así, procedimos a cruzar, de igual manera que se había hecho con *Erk*, la línea *K-Ras^{+/LSLG12V}* con las líneas *Mek1^{lox/lox}* (Catalanotti et al., 2009) y *Mek2^{-/-}* (Belanger et al., 2003). De esta forma, las líneas generadas presentaban una ausencia constitutiva de *Mek2*, y la expresión de *Mek1* se interrumpía cuando la Cre reconocía los sitios *loxP* que flanqueaban el exón 2 de su locus. Las líneas resultantes, y sus controles *K-Ras^{+/LSLG12V}*, fueron tratadas también a las 8 semanas de vida con adeno-Cre. El 50% de los animales *K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox}* (n=14) había muerto antes de la semana 44, habiendo alcanzado sus controles (n=20) este porcentaje en la semana 37.5 (36 vs 29.5, teniendo en cuenta que los animales fueron tratados a las 8 semanas de vida). Por tanto, los primeros vivían un 22% más que sus controles (tomando como 100% la supervivencia de los controles) (**Figura 17**). No muy diferente fue el resultado para los *K-Ras^{+/LSLG12V};Mek2^{-/-}* (n=19) y sus controles (n=20), en el que los primeros vivían un 19% más que los segundos (semanas después de ser tratados 45 vs 37) (**Figura 17**). Estas ligeras diferencias, entre controles y *knock outs*, no parecían indicar que alguna de las dos isoformas tuviera un papel preponderante en la aparición de los tumores. Esto se comprobó cuando se sacrificaron animales de los distintos genotipos, 6 meses después de haber sido infectados con adeno-Cre. No había diferencias significativas ni en el número de tumores, ni en la malignidad de los mismos, cuando se comparaban animales *K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox}* (n=7) y *K-Ras^{+/LSLG12V}* (n=6) (**Figura 18**). Tampoco existían diferencias en estos parámetros si se comparaba presencia (n=5) o ausencia (n=5) de *Mek2* (**Figura 18**). Estos resultados parecían indicar una mutua compensación entre ambas isoformas de *Mek*.

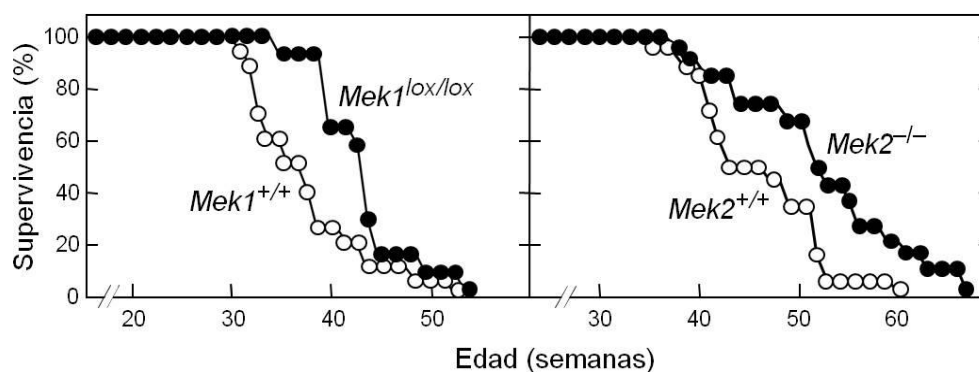


Figura 17. La ausencia de Mek1 o Mek2, en tumores inducidos por K-Ras^{G12V}, no implica un notable incremento de la esperanza de vida. Curva de supervivencia. Los animales fueron inoculados con adeno-Cre, en la 8ª semana de vida, a través de una cánula en la tráquea. Eje Y, porcentaje de animales vivos. Eje X, semanas de vida de los animales. **Panel izquierdo.** Círculos negros K-Ras^{+LSLG12V};Mek1^{lox/lox} (n=14), círculos blancos K-Ras^{+LSLG12V};Mek1^{+/+} (n=20). **Panel derecho.** Círculos negros K-Ras^{+LSLG12V};Mek2^{-/-} (n=19), círculos blancos K-Ras^{+LSLG12V};Mek2^{+/+} (n=20).

Para confirmar este resultado, se quiso descartar que, por razones técnicas, se diera la recombinación dentro del locus de K-Ras (y consecuente expresión del oncogén), con ausencia de recombinación dentro del locus de Mek1, dando lugar a tumores con Mek1 en ratones K-Ras^{+LSLG12V};Mek1^{lox/lox}. Se comprobó que esto no sucedía en tumores aislados de diferentes ratones K-Ras^{+LSLG12V};Mek1^{lox/lox}, porque en todos los tumores analizados (n=6) se observó una escisión eficaz de los alelos Mek1^{lox} por *southern blot* (Figura 19). Adicionalmente, este fenómeno quedó comprobado, a nivel de expresión de proteína, cuando en los 6 tumores analizados la proteína Mek1 se encontraba mayoritariamente ausente (Figura 20). Como era de esperar Mek2 no estaba presente en tumores (n=6) de animales K-Ras^{+LSLG12V};Mek2^{-/-} (Figura 20).

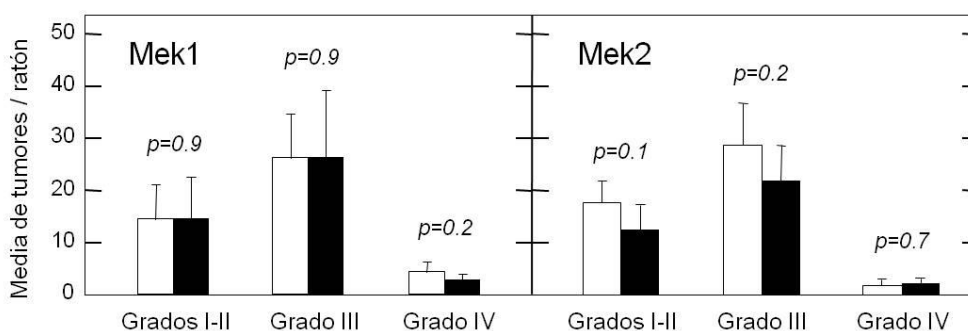


Figura 18. La ausencia de Mek1 o Mek2 no disminuye la carga tumoral inducida por la expresión del oncogén K-Ras^{G12V}. Número medio de tumores por ratón clasificados según el grado de malignidad (I-IV). Los animales fueron sacrificados 6 meses después de la infección. Las barras de error indican la desviación estándar. El p valor fue calculado mediante un análisis t de Student. **Panel izquierdo.** Barras blancas K-Ras^{+LSLG12V};Mek1^{+/+} (n=6), Barras negras K-Ras^{+LSLG12V};Mek1^{lox/lox} (n=7). **Panel derecho.** Barras blancas K-Ras^{+LSLG12V};Mek2^{+/+} (n=5), Barras negras K-Ras^{+LSLG12V};Mek2^{-/-} (n=5).

6. Resultados



Figura 19. Escisión efectiva de *Mek1^{lox}* en tumores inducidos por la expresión de *K-Ras^{G12V}*. El DNA fue extraído de tumores aislados de ratones *K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox}*. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de la infección con adeno-Cre. La digestión del DNA fue realizada con HindIII. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *Mek1^{lox}* y *Mek1⁻* aparecen en la figura.

Por otra parte, se quiso estudiar qué cambios se producían en la señalización de la vía, en aquellos tumores que no expresaban Mek1 o Mek2 (**Figura 20**). Así, se vio que no había cambios en los niveles de fosforilación de Erk1/2 (único efector conocido de Mek1/2), independientemente de que fuera Mek1 o Mek2 la proteína ausente. Es decir, en ausencia de Mek1, Mek2 puede conducir la señalización de la vía dentro de estos tumores, y Mek1 lo puede hacer cuando no está Mek2. Sin Mek1 los niveles de fosforilación de Mek1/2 no cambiaban, pudiendo indicar que, ante la pérdida de Mek1, los niveles de fosforilación de Mek2 aumentan para mantener la señalización. Una mayor cantidad de tumores debería de ser analizado para poder comprobar este resultado. Esto último se hizo más patente cuando se vio que, en los tumores en los que Mek2 estaba ausente, los niveles de fosforilación de Mek1/2 eran variables, haciendo pensar que era un suceso independiente del genotipo.

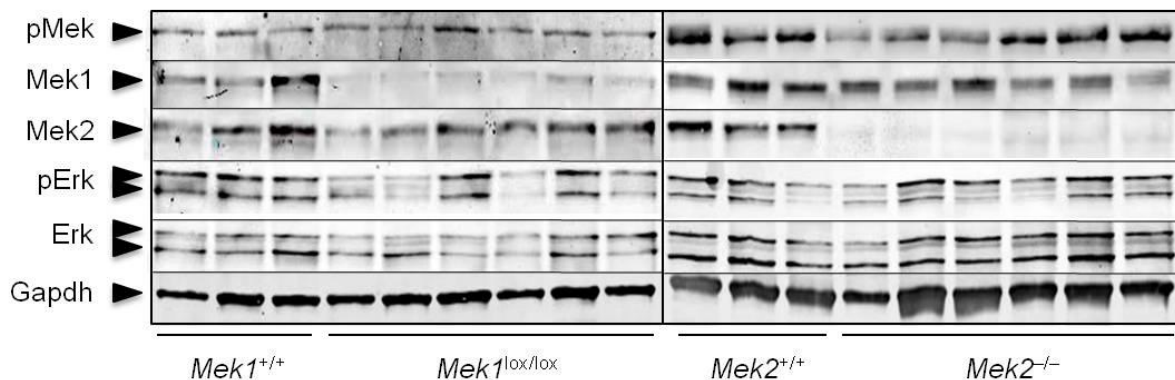


Figura 20. Ausencia de las proteínas Mek1 o Mek2 en los tumores inducidos por la expresión de *K-Ras^{G12V}*, y análisis del estado de la vía en los mismos. Western blot frente a pMek, Mek1, Mek2, pErk1/2 y Erk1/2, a partir de lisados de tumores de pulmón individualizados. Los tumores fueron aislados de diferentes ratones sacrificados a los 8 meses de haber sido inoculados con adeno-Cre. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha.

6.4 La ausencia de las isoformas Mek1/2 impide el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón, pero provoca efectos deletéreos especialmente en el epitelio intestinal

Según lo hasta ahora conocido, la única diana de Mek es Erk, por tanto los efectos de la eliminación de ambas proteínas Mek deberían ser teóricamente los mismos que los observados al eliminar Erk1/2. En cualquier caso, se generó la línea $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$.

Los animales $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ (n=14), tratados con adeno-Cre, comenzaron a morir pasada la semana 50 de vida (42 semanas después de la infección), habiendo muerto todos los controles $K-Ras^{+/LSLG12V}$ (n=10) en las semanas previas (**Figura 21**). Tal fue la diferencia de supervivencia entre ambos que, al tomar t_{50} como referencia, los $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ sobrevivían el doble que sus controles. Al realizarse el conteo de tumores en 8 animales $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ y 6 controles, se vio que había diferencias significativas en el número de tumores de grados II y III. Además, no se encontró ningún tumor de máximo grado (grado IV) en los $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ (**Figura 22**).

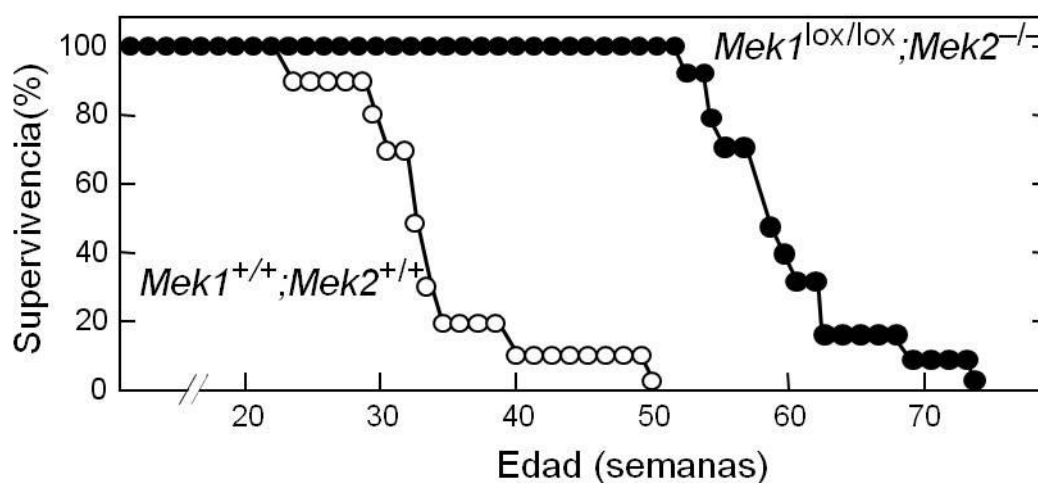


Figura 21. La ausencia de Mek1 y Mek2, en tumores inducidos por $K-Ras^{G12V}$, implica un notable incremento de la esperanza de vida. Curva de supervivencia. Los animales fueron inoculados con adeno-Cre, en la 8ª semana de vida, a través de una cánula en la tráquea. Eje Y, porcentaje de animales vivos. Eje X, semanas de vida de los animales. Círculos negros $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ (n=14), círculos blancos $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{+/+};Mek2^{+/+}$ (n=10).

A pesar de la reducción significativa en la carga tumoral, lo cual supuso el incremento en la esperanza de vida de los $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$, el hecho es que estos animales finalmente

6. Resultados

tuvieron que ser sacrificados ya que, debido al crecimiento de esos escasos tumores, tenían problemas respiratorios. Entonces, la cuestión era si la ausencia de Mek1/2 era necesaria para el crecimiento de los tumores, y por tanto sin Mek1/2 los tumores crecían peor, o si estas proteínas eran esenciales y por tanto los tumores no podían iniciarse en su ausencia. Para dilucidar esto se hizo un *southern blot* y un *western blot* de tumores procedentes de diferentes animales $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$, sacrificados 8 meses después de la inoculación adenoviral (**Figura 23**). En los 6 tumores analizados por *southern blot* se vio que, en todos ellos, había al menos un alelo $Mek1^{lox}$ sin recombinar. En los tumores analizados por *western blot* (n=4), Mek1 fue detectado en todos ellos, siempre en ausencia de Mek2. Por tanto, dado que todos los tumores que crecieron en estos animales mantenían Mek1, se puede decir que en ausencia de Mek2, Mek1 es absolutamente esencial para que los tumores promovidos por $K-Ras^{G12V}$ se desarrollen.

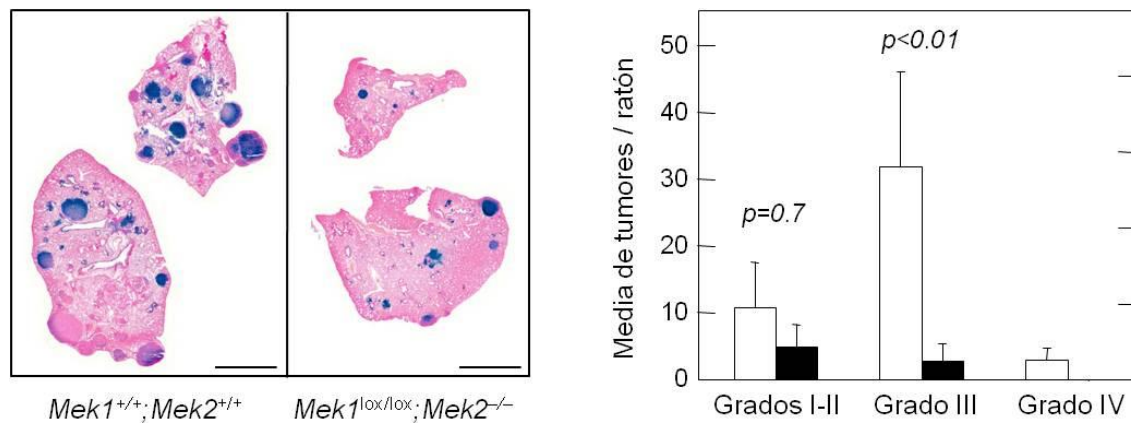


Figura 22. La ausencia de Mek1 y Mek2 provoca una disminución de la carga tumoral inducida por la expresión de $K-Ras^{G12V}$. Panel izquierdo. Tinción X-gal *whole mount* de lóbulos pulmonares. Los pulmones fueron extraídos de ratones sacrificados 6 meses después de la infección con adeno-Cre. Las células β -gal positivas (azules) expresaban $K-Ras^{G12V}$. Genotipos indicados en la figura. Barra de escala 5mm. Panel derecho. Número medio de tumores por ratón clasificados según el grado (I-IV). Las barras de error indican la desviación estándar. El p valor fue calculado mediante un análisis t de Student. Barras blancas $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{+/+};Mek2^{+/+}$ (n=6), Barras negras $K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ (n=8).

De igual manera que se hizo para Erk, los ratones $Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}$ fueron cruzados con la línea $RERT^{ert/ert}$, con el objetivo de estudiar los efectos deletéreos que pudiera conllevar la ausencia de ambas proteínas Mek. 5 ratones $Mek1^{+/+};Mek2^{+/+};RERT^{ert/ert}$ y 5 $Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-};RERT^{ert/ert}$ fueron tratados *ad libitum* con un pienso que contenía tamoxifeno. Antes que se cumplieran los 15 días después de iniciarse el tratamiento, todos los dobles mutantes para Mek tuvieron que ser sacrificados al haber perdido más del 20% de su peso (**Figura 24A**). Durante la necropsia se evidenció una pérdida total de los depósitos de grasa blanca, y un exceso de agua en las heces, poniendo de manifiesto que el animal sufría diarreas, siendo, esta última, una de las posibles explicaciones de la dramática pérdida de peso antes mencionada.

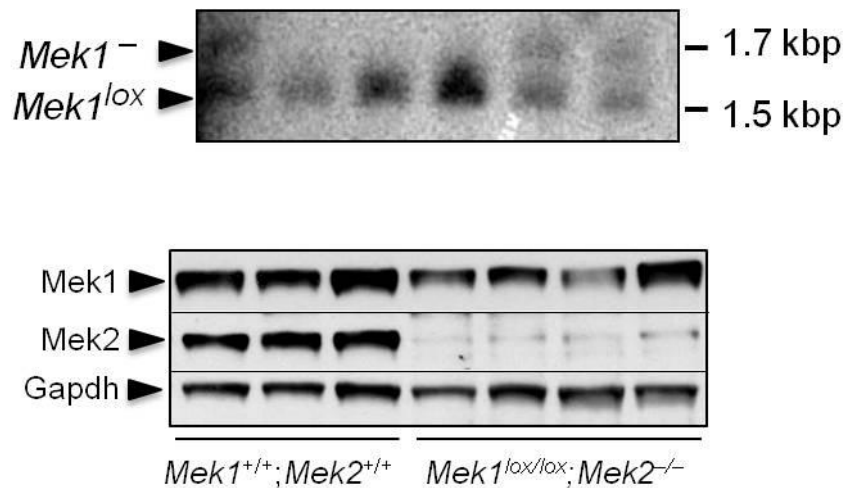


Figura 23. Mek1 es esencial para el desarrollo de los tumores inducidos por K-Ras^{G12V}, cuando Mek2 está ausente. Panel superior. Southern blot. El DNA fue extraído de tumores aislados de ratones *K-Ras^{+/LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}*. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de la infección con adeno-Cre. La digestión de DNA fue realizada con HindIII. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *Mek1^{lox}* y *Mek1*⁻ aparecen en la figura. **Panel inferior. Western blot** frente a Mek1 y Mek2, a partir de lisados de tumores de pulmón individualizados. Los tumores fueron aislados de diferentes ratones sacrificados a los 8 meses de haber sido inoculados con adeno-Cre. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha.

Un estudio previo, en el que se empleó un transgénico que permitía la expresión de Cre controlada por un promotor específico de piel, K14-CreERT2, mostró que la presencia de al menos una de las dos isoenzimas es requerida para la homeostasis de la epidermis (Scholl et al., 2007). Sin embargo, cuando se estudiaron las secciones de H&E, de los animales *Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-};RERT^{ert/ert}*, no se vieron reproducidos estos resultados obtenidos en la piel. Los defectos más acusados se vieron en el intestino delgado y en el colon (**Figura 24B**). El intestino presentaba un fenotipo parcheado, que iba desde zonas donde las vellosidades no se encontraban alteradas, hasta zonas de atrofia completa de las vellosidades intestinales, dejando una superficie intestinal completamente plana. Esta pérdida de superficie intestinal funcional podría ser causa de los problemas de mal absorción de ciertos nutrientes, lo cual contribuiría a la pérdida de peso. En el colon también existía una graduación de fenotipo, desde zonas con criptas perfectamente alineadas, a zonas donde había una alteración y reducción del número de criptas. La alteración en el colon provocaría los problemas en la reabsorción de agua con las consiguientes diarreas y un más que posible desequilibrio electrolítico.

Al realizar un *southern blot*, a partir de diferentes tejidos obtenidos de animales moribundos, se observó que la recombinación del alelo *Mek1^{lox}* era de un 80% en algunos tejidos como el colon y el intestino (**Figura 24C**). Esto podría explicar porque el fenotipo era más acusado, en estos tejidos, en los *Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-};RERT^{ert/ert}* que en los *Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (donde la delección del alelo *Erk2^{lox}* era alrededor del 50% después de una semana más). Por otra parte la escisión de *Mek1* en piel era del 50%,

6. Resultados

pudiendo esto explicar que no observáramos las alteraciones significativas que habían sido descritas previamente, en la literatura, para la pérdida de Mek1/2 en la piel. Por otro lado, este mejor funcionamiento de la Cre para producir la recombinación del alelo *Mek1^{lox}* que del *Erk2^{lox}*, explicaría por qué los animales *K-Ras^{+/-LSLG12V};Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-}* tienen una mayor esperanza de vida que los *K-Ras^{+/-LSLG12V};Erk1^{-/-};Erk2^{lox/lox}*. Una mayor eficacia de recombinación disminuyó la frecuencia en la que la recombinación del alelo *K-Ras^{LSLG12V}* se daba en ausencia de recombinación de *Mek1^{lox}* y por tanto una reducción en el número de tumores.

6.5 Distinta contribución de las proteínas Raf al desarrollo de tumores de pulmón inducidos por la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}*

La ausencia de las proteínas Mek, o de las proteínas Erk, tenía una gran efectividad en el bloqueo del desarrollo de los tumores originados en nuestro modelo de ratón, por el contrario, su eliminación sistémica causaba graves consecuencias en la homeostasis del ratón. Siempre pensando que este bloqueo de la aparición de tumores indicara un posible efecto sobre el mantenimiento de tumores, implicaría que el tratamiento con inhibidores frente a estas moléculas podría tener graves efectos secundarios. Esto nos hizo buscar, dentro de la vía Erk-Mapk, otras proteínas que tuvieran similares efectos sobre el desarrollo del tumor, reduciendo los efectos deletéreos sobre la homeostasis.

Las proteínas Raf son los inmediatos activadores de las proteínas Mek. Si entre las isoformas Mek o las Erk había algunas diferencias demostradas, éstas son mayores entre las Raf. Así se ha demostrado que desempeñan roles distintos en el desarrollo embrionario. Los embriones *A-Raf^{-/-}* son viables, aunque mueren después del nacimiento debido a defectos neurológicos e intestinales, dependiendo del fondo genético (Pritchard et al., 1996). Los embriones *B-Raf^{-/-}* tienen defectos graves en el desarrollo de la placenta, además de problemas neurológicos cuando se elimina B-Raf sólo en el epiblasto (Galabova-Kovacs et al., 2006b; Wojnowski et al., 1997). Finalmente, los embriones *c-Raf^{-/-}* mueren por un incremento de apoptosis generalizada en el embrión (Wojnowski et al., 1998) y específicamente en el hígado fetal (Mikula et al., 2001). Además se han caracterizado diversas diferencias entre ellas: en su activación, en la actividad quinasa sobre Mek y en funciones independientes de la fosforilación de Mek (Galabova-Kovacs et al., 2006a). Para comprobar la contribución de las proteínas Raf al desarrollo de los tumores de pulmón promovidos por *K-Ras^{G12V}*, se cruzaron los ratones *K-Ras^{+/-LSLG12V}*, con modelos de supresión condicional de B-Raf (Chen et al., 2006) y c-Raf (Jessenberger et al., 2001). Hasta el momento no ha sido generado ningún modelo en cual se pudiera suprimir la expresión de A-Raf de forma condicional y como se ha dicho, en el modelo *knock out* en línea germinal, los animales no sobreviven mucho después del nacimiento. Por este motivo no se estudió el papel de la quinasa A-Raf, que por otra parte es la quinasa Raf que parece ser menos esencial en el ratón.

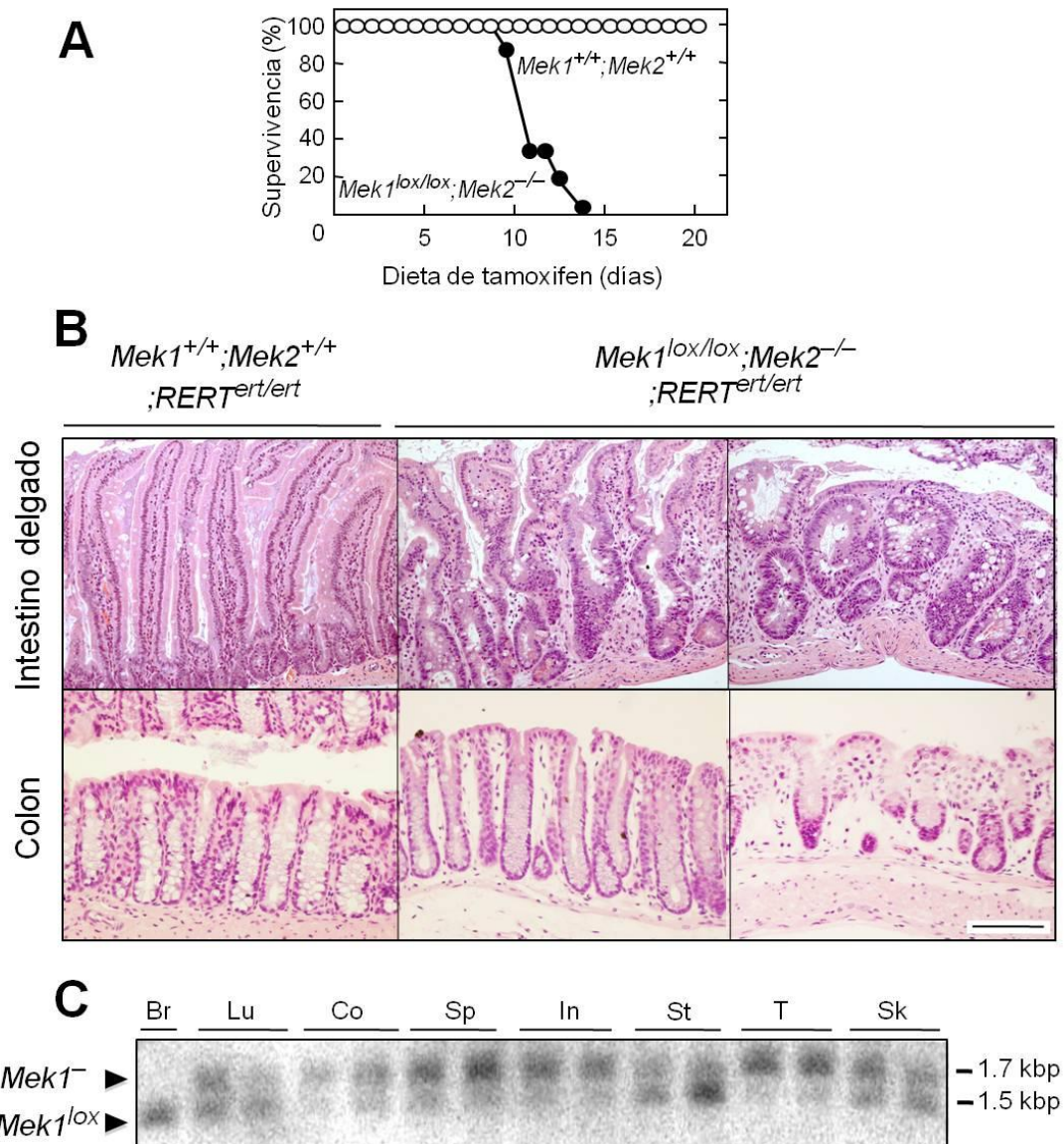


Figura 24. Mek1 es esencial para la homeostasis del animal en ausencia de Mek2. **A.** Curva de supervivencia. Animales de 30 días de edad fueron alimentados *ad libitum* con un pienso que contenía tamoxifeno. Eje X, supervivencia de los animales. Eje Y, días después de iniciarse el tratamiento. Círculos blancos $Mek1^{+/+}; Mek2^{+/+}; RERT^{ert/ert}$ (n=6) Círculos negros. $Mek1^{lox/lox}; Mek2^{-/-}; RERT^{ert/ert}$ (n=6). **B.** Tinción H&E de secciones de parafina de intestino delgado y colon obtenidos de animales $Mek1^{+/+}; Mek2^{+/+}; RERT^{ert/ert}$ y $Mek1^{lox/lox}; Mek2^{-/-}; RERT^{ert/ert}$, los cuales habían sido alimentados *ad libitum* con pienso que contenía tamoxifeno. Éstos fueron sacrificados al perder el 20% de su peso. Barra de escala 100µm. Intestino delgado. Arquitectura normal (Izquierda). Alteración de la arquitectura normal, con vellosidades intestinales aplastadas y acortadas, incremento de la lámina propia debido al edema, infiltrado linfoplasmacítico y criptas alteradas (Medio). Arquitectura intestinal más alterada, con regiones completamente aplanadas, hiperplasia de las células caliciformes y criptas con formas irregulares y ramificadas con incremento de la actividad mitótica (Derecha). Colon. Arquitectura normal (Izquierda). Edema, infiltrado inflamatorio crónico y pérdida progresiva de criptas (Medio y Derecha). **C.** Southern blot. El DNA fue aislado de diferentes tejidos. Los tejidos fueron obtenidos de animales $Mek1^{lox/lox}; Mek2^{-/-}; RERT^{ert/ert}$ los cuales habían sido alimentados *ad libitum* con pienso que contenía tamoxifeno. Éstos fueron sacrificados cuando perdieron más del 20% de su peso. La digestión del DNA se realizó con HindIII. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos $Mek1^{lox}$ y $Mek1^{-}$ aparecen en la figura. Los distintos tejidos analizados fueron: Cerebro (Br), Pulmón (Lu), Colon (Co), Bazo (Sp), Intestino delgado (In), Estómago (St), Piel de la cola (T), Piel de la espalda (Sk).

6. Resultados

6.5.1 Desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V} en ausencia de B-Raf

Según los datos hasta ahora obtenidos, B-Raf parece el miembro de la familia Raf más importante en la transmisión de la señal que proviene de K-Ras. Es el que mejor interactúa con Ras, el que ha demostrado mayor capacidad de fosforilar Mek *in vitro* y también se ha visto que los MEFs que no poseen B-Raf tienen una menor activación de pErk (Revisado por Galabova-Kovacs et al., 2006a). Sin embargo, después de tratar con adeno-Cre animales $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox}$ (n=25) y sus correspondientes controles (n=28), a las 8 semanas de edad todos ellos, algunos miembros de ambos grupos tuvieron que ser sacrificados por problemas respiratorios alrededor de las 20 semanas después del tratamiento (28 semanas de vida) (Figura 25). La diferencia entre estos grupos, para cuando ambos alcanzaron el 50% de supervivencia, fue de un 1.2% (41.5 semanas frente a 42, teniendo en cuenta la fecha de tratamiento). Esta ausencia de diferencia en la supervivencia era explicada tras ver que los animales de ambos grupos (5 $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox}$ y 5 controles), sacrificados 6 meses después del tratamiento, no presentaban diferencias significativas ni en el número de tumores de pulmón, ni en la malignidad de los mismos (Figura 26).

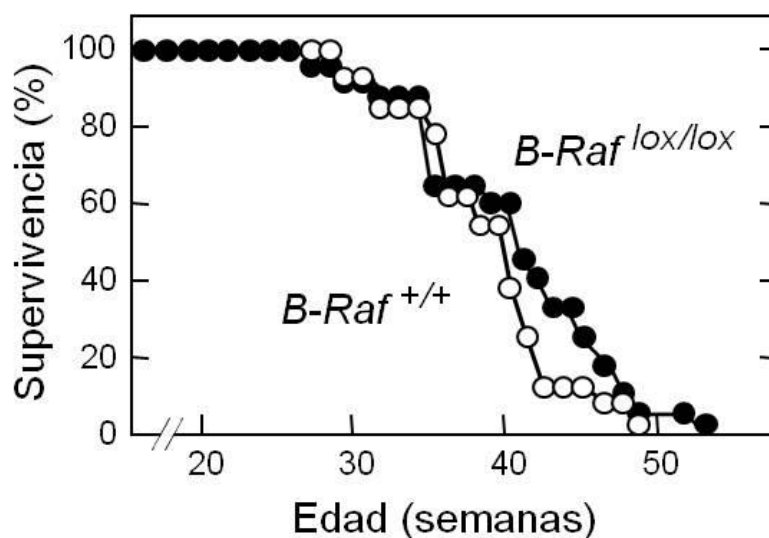


Figura 25. La ausencia de B-Raf, en tumores inducidos por K-Ras^{G12V}, no supone un incremento significativo en la esperanza de vida. Curva de supervivencia. Los animales fueron inoculados con adeno-Cre, en la 8ª semana de vida, a través de una cánula en la tráquea. Eje Y, porcentaje de animales vivos. Eje X, semanas de vida de los animales. Círculos negros $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox}$ (n=25), círculos blancos $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{+/+}$ (n=28).

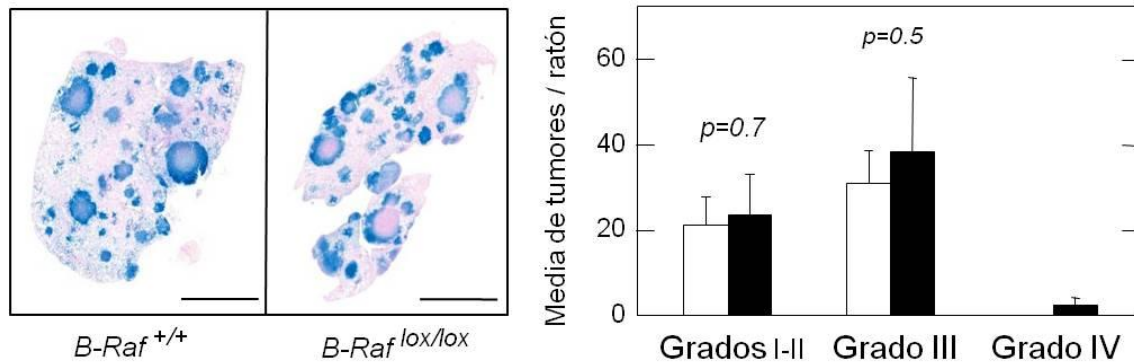


Figura 26. La ausencia de B-Raf no afecta a la carga tumoral inducida por la expresión de K-Ras^{G12V}. Panel izquierdo. Tinción X-gal *whole mount* de lóbulos pulmonares. Los pulmones fueron extraídos de ratones sacrificados 6 meses después de la infección con adeno-Cre. Las células β-gal positivas (azules) expresaban K-Ras^{G12V}. Genotipos indicados en la figura. Barra de escala 5mm. **Panel derecho.** Número medio de tumores por ratón clasificados según el grado (I-IV). Las barras de error indican la desviación estándar. El p valor fue calculado mediante un análisis t de Student. Barras blancas *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *B-Raf*^{+/+} (n=5), Barras negras *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *B-Raf*^{lox/lox} (n=5).

De igual manera a lo que se hizo anteriormente, se comprobó si B-Raf se había eliminado en los tumores de animales *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *B-Raf*^{lox/lox}. Así, se vio por *southern blot* (Figura 27A) una recombinación efectiva del alelo *B-Raf*^{lox} en los 10 tumores analizados, y por *western blot* (Figura 27B) se vio la ausencia de la proteína en 6 tumores distintos. La ausencia de B-Raf, mostrada por la inmunohistoquímica (Figura 27C), corroboró la información del *southern blot* y del *western blot*.

Como la ausencia de B-Raf podría estar compensada por las otras proteínas Raf, se quiso ver el estado de señalización de la vía. No se vio un incremento de expresión tanto en los niveles de A-Raf como en los de c-Raf, sugiriendo que los niveles fisiológicos de las mencionadas proteínas eran suficientes para transmitir la señal en ausencia de B-Raf (Figura 27B). Como se dijo anteriormente, B-Raf se ha venido considerando el principal activador de Mek, así por ejemplo, en la placenta, a pesar que se expresan A-Raf y c-Raf, la expresión de B-Raf es esencial para mantener la activación de Mek (Galabova-Kovacs et al., 2006b). También en fibroblastos se ha visto que, en ausencia de B-Raf, hay una caída en el 60% en los niveles de Erk fosforilado (Galabova-Kovacs et al., 2006b; Pritchard et al., 2004). Sin embargo, cuando se miraron los niveles de Mek fosforilado por *western blot* (Figura 27B) y de Erk fosforilado por *western blot* y por inmunohistoquímica (Figuras 27B y 27C) no se observaron diferencias entre los tumores control *K-Ras*^{+/LSLG12V} y los tumores de animales *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *B-Raf*^{lox/lox}. Por tanto, B-Raf parece no tener tanta importancia en la activación de la vía en estos adenomas y adenocarcinomas de pulmón, como la puede tener en otros tejidos.

6. Resultados

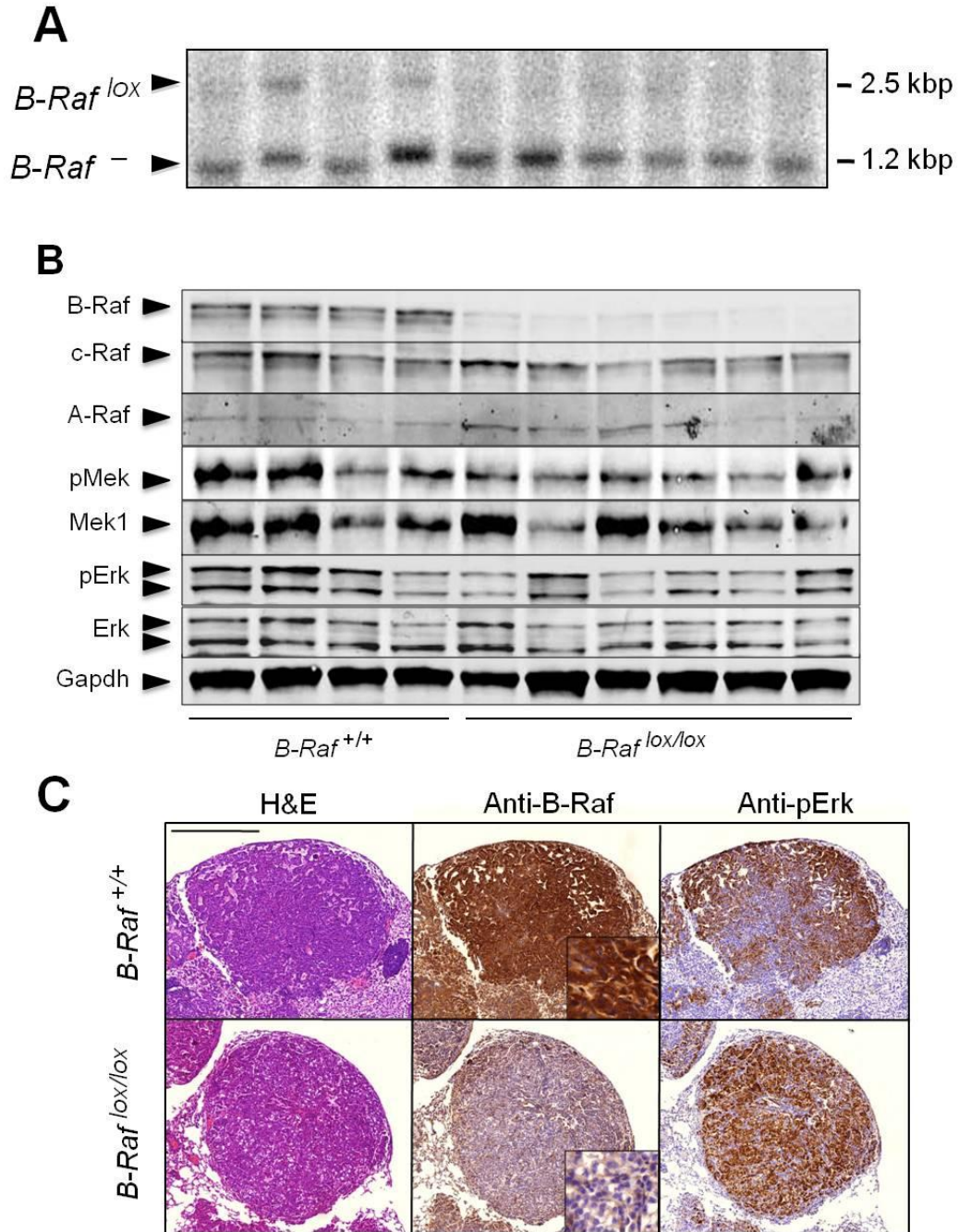


Figura 27. B-Raf se elimina eficientemente en los tumores inducidos por K-Ras^{G12V} sin afectar a la señal de la vía. **A.** *Southern blot*. El DNA fue extraído de tumores aislados de ratones *K-Ras*^{+/^{LSLG12V}; *B-Raf*^{lox/lox}. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de la infección con adeno-Cre. La digestión de DNA fue realizada con HindIII. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *B-Raf*^{lox} y *B-Raf*⁻ aparecen en la figura. **B.** *Western blot* frente a B-Raf, c-Raf, A-Raf, pMek, Mek1, pErk y Erk, a partir de lisados de tumores de pulmón individualizados. Los tumores fueron aislados de diferentes ratones sacrificados a los 8 meses de haber sido inoculados con adeno-Cre. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha. **C.** Los tumores mantienen la señalización de pErk en ausencia de B-Raf. Secciones consecutivas de H&E (Izquierda) e inmunohistoquímicas contra B-Raf (Medio) y contra p-Erk (Derecha). Los tumores fueron obtenidos de animales *K-Ras*^{+/^{LSLG12V}; *B-Raf*^{+/+} (arriba) y *K-Ras*^{+/^{LSLG12V}; *B-Raf*^{lox/lox} (abajo). Barra de escala 0,5 mm.}}}

6.5.2 La supresión de c-Raf impide el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por K-Ras^{G12V}, sin provocar efectos deletéreos su eliminación sistémica

La proteína B-Raf ha sido considerada la principal activadora de Mek, dándosele a c-Raf un mayor peso en las funciones diferentes a la activación de esta vía. Sin embargo, dados los resultados obtenidos cuando B-Raf era eliminado, podría pensarse que quizá los requerimientos de señalización cambiaran en tumores de pulmón impulsados por la señal oncogénica de K-Ras, tomando c-Raf un peso más importante en este contexto. De esta forma, al igual que se había hecho para todas las líneas anteriores, se trataron con adeno-Cre animales de 8 semanas de los genotipos *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *c-Raf*^{lox/lox} (n=23), así como sus controles *K-Ras*^{+/LSLG12V} (n=22) (**Figura 28**). Como se puede observar, había una gran diferencia entre la supervivencia de ambos grupos, siendo la de los primeros prácticamente el doble que la de sus controles. Esta diferencia en la supervivencia, era la traducción de la diferencia en el número de tumores que existía entre ambos grupos. Cuando se sacrificaron 8 ratones *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *c-Raf*^{lox/lox}, se vio que la carga tumoral era significativamente menor, tanto en el número de lesiones como en la gravedad de las mismas, comparándolos con un grupo control (n=8) (**Figura 29**).

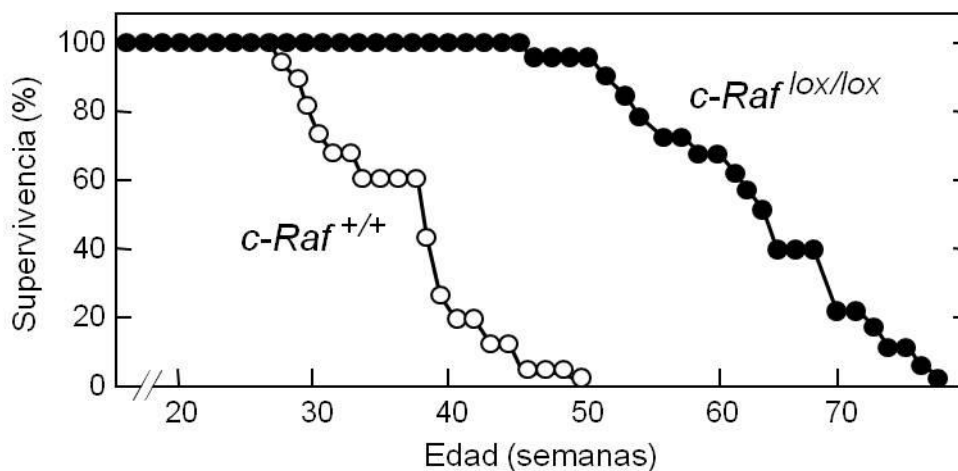


Figura 28. La ausencia de c-Raf incrementa la esperanza de vida en ratones que expresan K-Ras^{G12V} en el pulmón. Curva de supervivencia. Los animales fueron inoculados con adeno-Cre en la 8ª semana de vida, a través de una cánula en la tráquea. Eje Y, porcentaje de animales vivos. Eje X, semanas de vida de los animales. Círculos negros *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *c-Raf*^{lox/lox} (n=23), círculos blancos *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *c-Raf*^{+/+} (n=22).

Sin embargo, como ocurría cuando Mek1/2 o Erk1/2 eran eliminados, en presencia de K-Ras^{G12V}, aún crecían algunos tumores, los cuales finalmente provocaban la muerte de los animales. Para resolver si B-Raf y A-Raf podían sostener, en ausencia de c-Raf, un cierto desarrollo de los tumores aunque de una forma más lenta, o sí por el contrario, c-Raf era esencial para su desarrollo, se aislaron tumores procedentes de animales *K-Ras*^{+/LSLG12V}; *c-Raf*^{lox/lox}. Así se pudo comprobar, mediante análisis de DNA

6. Resultados

genómico, que todos los tumores aislados (n=11) procedían de células en las que o se había dado la recombinación en un alelo *c-Raf^{lox}*, o como ocurría en la mayoría de los casos, en ninguno de los dos alelos (**Figura 30**). De igual manera, se observó por *western blot* que c-Raf estaba presente en todos los tumores analizados (n=9) (**Figura 30**). Al no encontrarse ningún tumor que se desarrollara en ausencia de c-Raf, se puede decir que éste es esencial para el desarrollo de tumores de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V}.

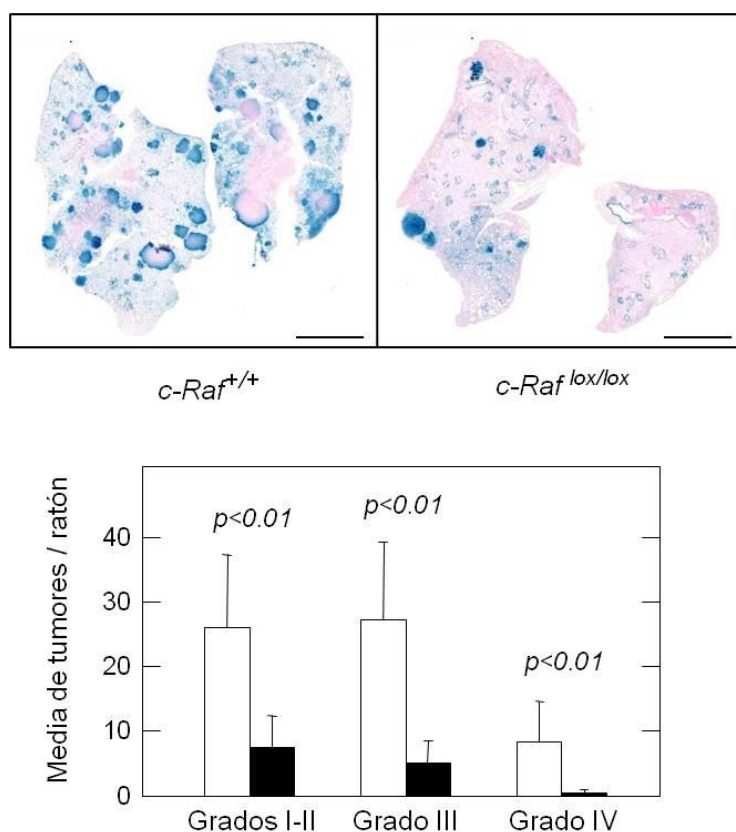


Figura 29. La ausencia de c-Raf reduce significativamente la carga tumoral inducida por la expresión de K-Ras^{G12V}. **Panel superior.** Tinción X-gal *whole mount* de lóbulos pulmonares. Los pulmones fueron extraídos de ratones sacrificados 6 meses después de la infección con adeno-Cre. Las células β-gal positivas (azules) expresaban K-Ras^{G12V}. Genotipos indicados en la figura. Barra de escala 5mm. **Panel inferior.** Número medio de tumores por ratón clasificados según el grado (I-IV). Las barras de error indican la desviación estándar. El p valor fue calculado mediante un análisis t de Student. Barras blancas *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{+/+}* (n=8), Barras negras *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox}* (n=8).

Los resultados obtenidos hasta ahora no diferían de los obtenidos con la supresión de ambos Erk o Mek, por tanto era necesario conocer si, a diferencia de los anteriores, la eliminación de c-Raf no conllevaría efectos deletéreos para el animal. En relación a esto, sólo se ha publicado un estudio de eliminación de c-Raf en tejidos específicos en adulto. Así, mediante la utilización de una Cre controlada por un promotor de músculo cardíaco, se observó que, si bien la eliminación de c-Raf en cardiomiocitos producía un incremento en su tasa de apoptosis, este hecho no era letal para el individuo (Yamaguchi et

al., 2004). En cualquier caso, quizá una acumulación de pequeños fallos en distintos órganos podría conllevar a la muerte de los individuos. Sin embargo, los ratones *c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* y sus controles *c-Raf^{+/+}; RERT^{ert/ert}* fueron alimentados *ad libitum* con el pienso que contenía tamoxifeno, y tras tres meses de tratamiento no hubo ninguna baja, y no se observó ninguna sintomatología, así como ninguna alteración en la actividad de los ratones.

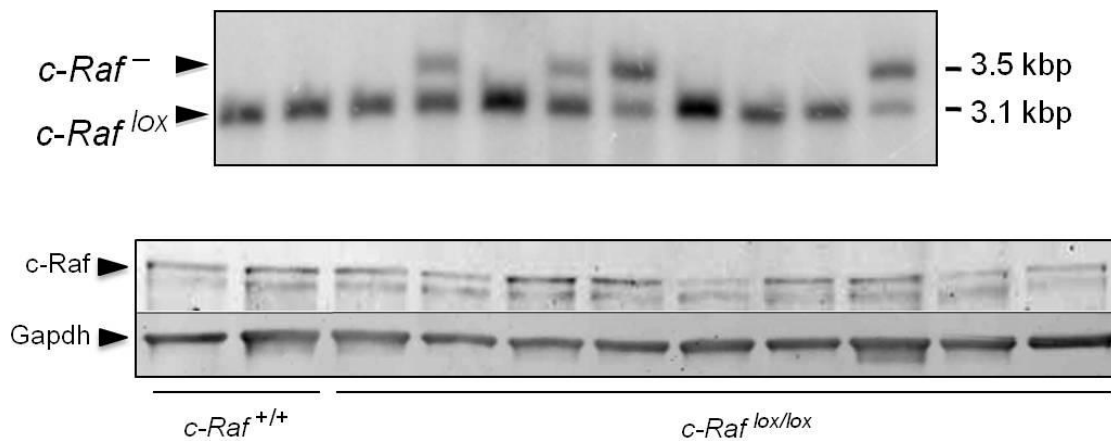


Figura 30. c-Raf es esencial para el desarrollo de los tumores inducidos por K-Ras^{G12V}. Panel superior. *Southern blot*. El DNA fue extraído de tumores aislados de ratones *K-Ras^{+/-LSLG12V}; c-Raf^{lox/lox}*. Los ratones fueron sacrificados 8 meses después de la infección con adeno-Cre. La digestión de DNA fue realizada con PstI. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *c-Raf^{lox}* y *c-Raf* aparecen en la figura. Panel inferior. *Western blot* frente a c-Raf a partir de lisados de tumores de pulmón individualizados. Los tumores fueron aislados de diferentes ratones sacrificados a los 8 meses de haber sido inoculados con adeno-Cre. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha.

Una posible explicación era que nuestra línea de Cre-ERT2 no hubiera funcionado con alta eficiencia en algunos tejidos, y la supervivencia de los animales fuera debida a una recombinación ineficiente en el locus de c-Raf. Así, pasados tres meses de tratamiento se sacrificaron los animales y se obtuvieron muestras para realizar un *southern blot*. Sorprendentemente, en la mayoría de los tejidos el alelo *c-Raf⁻* suponía casi un 90%, especialmente en aquellos tejidos de mayor índice proliferativo y por tanto de mayor tasa de renovación, en los que se podrían haber esperado más alteraciones (**Figura 31**). Cuando se analizaron las secciones teñidas con H&E de diferentes tejidos, tampoco se detectaron mayores defectos histológicos (datos no mostrados). Por tanto, c-Raf no es esencial para la homeostasis del ratón.

6. Resultados

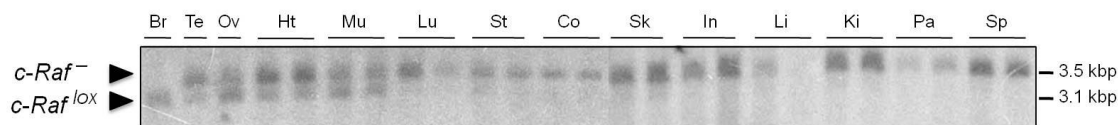


Figura 31. Escisión de c-Raf en diferentes tejidos de animales adultos. *Southern blot* a partir de DNA aislado de diferentes tejidos. Los tejidos fueron obtenidos de animales *c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* los cuales habían sido alimentados *ad libitum* con pienso que contenía tamoxifeno. Estos fueron sacrificados a los 3 meses de iniciarse el tratamiento. La digestión del DNA fue realizada con PstI. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *c-Raf^{lox}* y *c-Raf⁻* aparecen en la figura. Los distintos tejidos analizados fueron: Cerebro (Br), Testículo (Te), Ovario (Ov), Corazón (Ht), Músculo Estriado (Mu), Pulmón (Pu), Estómago (St), Colon (Co), Piel de la espalda (Sk), Intestino delgado (In), Hígado (Li), Riñón (Ri), Páncreas (Pa) y Bazo (Sp).

6.5.3 La escisión eficiente de B-Raf y c-Raf en la mayoría de los tejidos no implica consecuencias en la salud general del ratón adulto

Los inhibidores de las proteínas Raf existentes en la actualidad, o bien inhiben eficazmente a B-Raf (en una forma superior a lo que inhiben c-Raf), o bien inhiben en similar medida a B-Raf y c-Raf (Revisado por Flaherty y McArthur, 2010). Para tratar de simular genéticamente la actuación de estos inhibidores, se generó la línea *B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*, y sus correspondientes controles *B-Raf^{+/+};c-Raf^{+/+};RERT^{ert/ert}*. Animales de ambas líneas fueron alimentados *ad libitum* con un pienso que contenía tamoxifeno. De similar manera a lo que ocurrió con la eliminación sistémica de c-Raf, después de 3 meses no se había producido ninguna baja, no había síntomas de alguna patología y los animales no presentaban alteración en su actividad. Al analizarse la escisión mediante *southern blot* (**Figura 32**) se vio que, mientras que para *B-Raf* la escisión fue buena en todos los tejidos (prácticamente un 100% en todos ellos), para *c-Raf* había tejidos, como el pulmón, con porcentaje de escisión del 70-80%, mientras que otros, como el páncreas o el bazo, tenían una escisión completa. También se analizaron secciones de diferentes tejidos, pero no se encontraron alteraciones en la histología de los mismos (datos no mostrados). Por tanto, con la salvedad de que las escisiones no fueron del 100% para los dos loci en todos los tejidos, se podría decir que la mayoría de los tejidos adultos no sufren alteraciones graves en ausencia de B-Raf y c-Raf.

Una cuestión que se planteaba en ese momento era que si en teoría B-Raf y c-Raf son los principales activadores de la vía Erk-Mapk, la ausencia de estos se tendría que traducir en un descenso de los niveles de Erk fosforilado y Mek fosforilado. Para estudiar este posible efecto, se escogieron los tejidos en los que mejor escisión conjunta de B-Raf y c-Raf se había producido para realizar un *western blot* (**Figura 33**). Los niveles de fosforilación de Mek y de Erk eran muy variables entre los diferentes tejidos, pero no se observaron diferencias, en la mayoría de los tejidos, entre los controles y animales *B-Raf^{lox/lox}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*. Sólo se observó una caída de pMek, y consecuentemente de pErk, en el

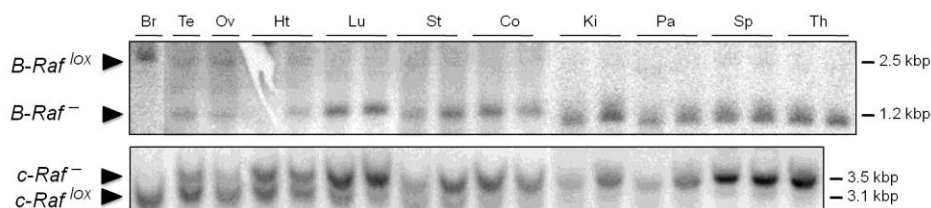


Figura 32. Escisión de B-Raf y c-Raf en tejidos procedentes de animales adultos. Southern blot a partir de DNA aislado de diferentes tejidos. Los tejidos fueron obtenidos de animales *B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*, los cuales habían sido alimentados *ad libitum* con pienso que contenía tamoxifeno durante 3 meses (desde día p30). El DNA fue digerido con HindIII, para *B-Raf^{lox}* y *B-Raf^{-/-}*, o PstI, para *c-Raf^{lox}* y *c-Raf^{-/-}*. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *B-Raf^{lox}*, *B-Raf^{-/-}*, *c-Raf^{lox}*, y *c-Raf^{-/-}* aparece en la figura. Los diferentes tejidos analizados fueron Cerebro (Br), Testículo (Te), Ovario (Ov), Corazón (Ht), Pulmón (Lu), Estómago (St), Colon (Co), Riñón (Ki), Páncreas (Pa), Bazo (Sp) y Timo(Th).

intestino delgado y en el colon. Aunque habría que confirmar este resultado con más muestras, el hecho que en el animal en el que la eliminación de B-Raf y c-Raf había sido peor en el colon, KO2, tuviera una menor caída de pMek y p-Erk que el otro animal analizado, KO1, apoyaba la existencia de una correlación entre los niveles de fosforilación de estas proteínas y los niveles de B-Raf y c-Raf, dentro de estos órganos. También se quiso ver si en ausencia de B-Raf/c-Raf, los niveles de expresión de A-Raf se veían incrementados para mantener la señal. Según se observó mediante *western blot* (**Figura 33**), estos cambios no se dieron, sin embargo, no se pueden descartar otros factores, como el aumento de los niveles de activación del A-Raf existente en la célula, o la inhibición de las fosfatasa que normalmente actúan limitando la señal, o una combinación de ambos hechos.

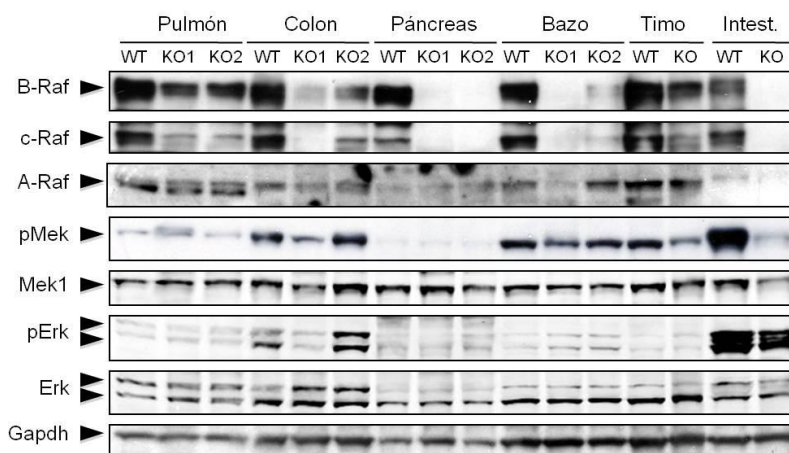


Figura 33. Los niveles de pMek y pErk no cambian significativamente en tejidos en los cuales se ha eliminado B-Raf y c-Raf. Western blot frente a B-Raf, c-Raf, A-Raf, pMek, Mek1, pErk1/2 y Erk1/2, a partir de lisados de diferentes tejidos. Los tejidos fueron aislados de ratones *B-Raf^{+/+};c-Raf^{+/+};RERT^{ert/ert}(wt)* y *B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (KO1 y KO2) que fueron tratados, *ad libitum*, con pienso que contenía tamoxifeno durante 3 meses (desde día p30). GAPDH fue empleado como control de carga. Los tejidos son indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha.

6. Resultados

Sería útil la generación de un triple *knock out* condicional para las tres proteínas Raf, y así poder conocer si es A-Raf el único encargado de mantener la señal, en ausencia de B-Raf/c-Raf, o si hay otras quinasas que pudieran activar Mek de una forma independiente de Raf.

6.6 La ausencia de c-Raf impide el incremento del número de células que expresan K-Ras^{G12V}, por un mecanismo diferente a la apoptosis o la senescencia

Dado que no se logró aislar ningún tumor que no expresara c-Raf, para intentar averiguar por qué las células que expresan K-Ras^{G12V}, en ausencia de c-Raf, no daban lugar a tumores se recurrió a estudiar secciones de pulmón a tiempos tempranos después de la activación de la expresión del oncogén.

Lo primero que se hizo fue establecer la ventana de tiempo en la que se marcaban las diferencias entre los *K-Ras^{+/LSLG12V}* y los *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox}*. Para ello nos valimos de nuestro modelo, en el cual *K-Ras^{G12V}* se expresa junto a *lacZ* en un mensajero bicistrónico. Por tanto, al expresarse la β -galactosidasa, y mediante una tinción de X-gal, se podía saber que células estaban expresando el *K-Ras^{G12V}* (Guerra et al., 2003). De esta manera, se procedió a contar el número de células que eran β -gal positivas/superficie a distintos tiempos en ambos grupos. Para ello se trataron, con 4-OH-tamoxifeno, animales *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* y *K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}*, y se hicieron dos grupos (para cada genotipo), uno se sacrificó a 15 días y el otro a 30 días después del tratamiento. La razón de tratarlos con 4-OH-tamoxifeno, en lugar de inocular adenovirus, se debió a que la inflamación, acarreada por la infección, provocaba un incremento en el número de macrófagos en el pulmón que aparecían como falsos positivos a la tinción X-gal. Se observó que a 15 días no había diferencias significativas en el número de células β -gal positivas entre los controles y los animales *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*, sin embargo, a 30 días sí que se observaron diferencias significativas (**Figura 34**). Además, el número de células β -gal positivas entre 15 y 30 días se mantenía o crecía muy ligeramente dentro del grupo de animales *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*. Se podría inferir, por tanto, que estas células habían dejado de proliferar. Sin embargo, sabíamos que algunas células “escapaban” a la escisión de c-Raf, y por ello no se podía descartar que las células sin c-Raf hubieran muerto o se hubieran eliminado, y que las células que “habían escapado” de la escisión mantuvieran los niveles de células β -gal positivas. Para tratar de esclarecer esta cuestión, se intentaron estudiar todos aquellos mecanismos en los que se ha descrito alguna acción de c-Raf.

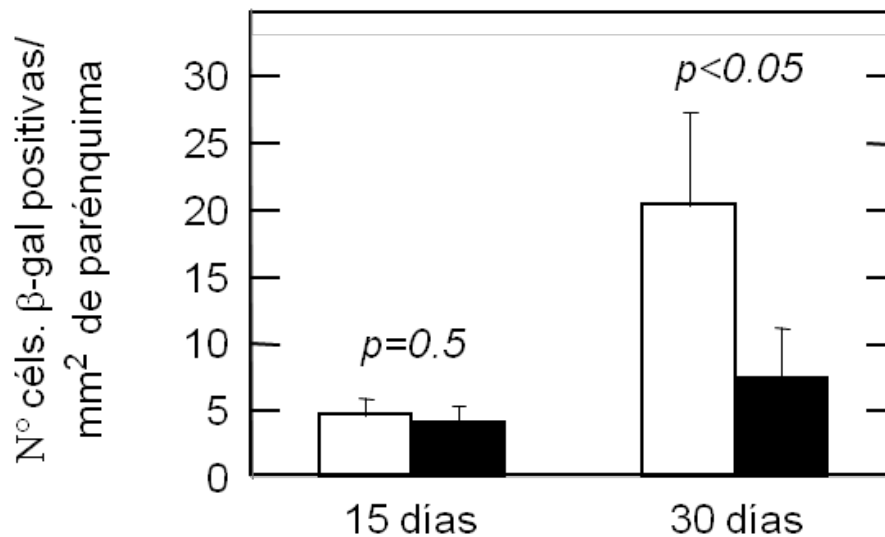


Figura 34. Deficiencia en el incremento de células pulmonares K-Ras^{G12V} en ausencia de c-Raf. Cuantificación de las células que expresan K-Ras^{G12V} mediante una tinción X-gal (basándonos en que la β-galactosidasa se expresa al mismo tiempo que K-Ras^{G12V}) en secciones de criostato de pulmón. Los pulmones se extrajeron de animales, *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* (n=3) y *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{-/-}; RERT^{ert/ert}* (n=3), los cuales habían sido tratados con 4-OH-tamoxifeno, y sacrificados 15 y 30 días después del tratamiento. El p valor fue calculado según el test t de Student. La barra de error representa la desviación estándar.

Dado que se ha visto que la presencia de Erk es esencial para el desarrollo de estos tumores, se quiso ver si la eliminación de c-Raf afectaba a pErk en estos estadios tempranos del desarrollo del tumor. Como se ha mencionado, c-Raf no se considera el principal activador de la vía Erk-Mapk, pero se ha visto que, en ciertos tipos celulares, c-Raf es más importante que B-Raf en esta función (Rubiolo et al., 2006). Para ello, se intentó ver como variaba el porcentaje de células pErk positivas, dentro de las β-gal positivas. Desafortunadamente, debido a problemas técnicos, no se consiguió una doble tinción pErk/X-gal satisfactoria para un conteo. Como aproximación alternativa se estudió la variación de pErk en el pulmón en presencia o ausencia de c-Raf. Así, se contaron el número de células pErk positivas/superficie a tiempos tempranos del desarrollo del tumor. Este número era comparable en *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* y en sus controles. Sin embargo, el número de células pErk positivas en el control era bastante alto, por lo que el cambio que pudiera generar el pequeño número de células *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*, podría pasar desapercibido.

Por otro lado, el papel de c-Raf en apoptosis ha sido ampliamente caracterizado. Así, como se mencionó anteriormente, los embriones *c-Raf^{-/-}* mueren debido a un incremento de la apoptosis (Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 1998) y la eliminación específica de c-Raf en el corazón también supone un incremento en la apoptosis (Yamaguchi et al., 2004). Además, este papel ha sido molecularmente caracterizado conociéndose que c-Raf inhibe, por interacción, a las quinasas proapoptóticas Ask1 (Chen

6. Resultados

et al., 2001) y Mst2 (O'Neill et al., 2004). Por ello se estudiaron los niveles de caspasa-3 activada (marcador de apoptosis) en animales $K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ y sus controles, 15 y 30 días después de la inducción de la expresión del oncogén, sin encontrarse un incremento de apoptosis (Figura 35). Como la apoptosis es un fenómeno que ocurre en una ventana de tiempo relativamente pequeña, se miraron también los niveles de caspasa-3 activada durante 5 días a partir del 5º día después de inducir la expresión del oncogén, sin encontrarse tampoco un incremento de apoptosis.

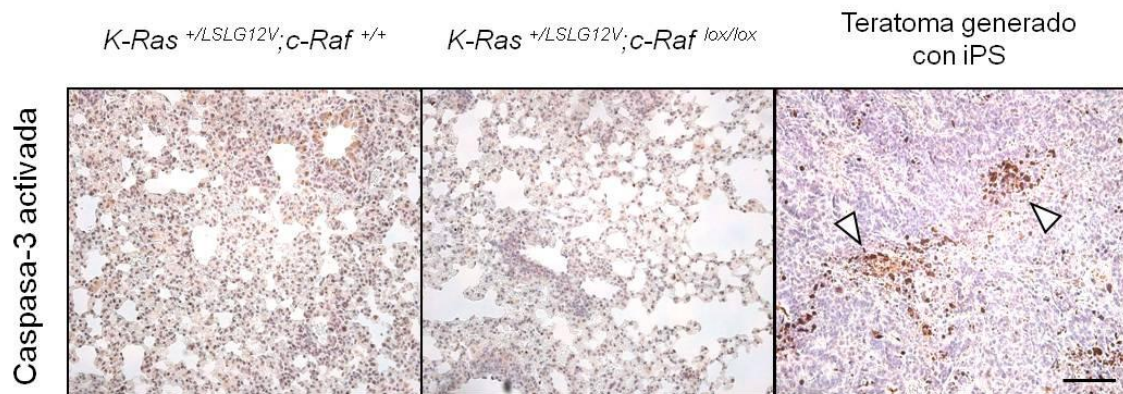


Figura 35. La eliminación de c-Raf no provoca la apoptosis de las células pulmonares que expresan K-Ras^{G12V}. Inmunohistoquímica frente a Caspasa-3 activada en secciones de parafina de pulmón. Los pulmones se extrajeron de animales $K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{+/+};RERT^{ert/ert}$ (Izquierda) y $K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (Medio) que habían sido tratados 30 días antes con adeno-Cre. Como control de apoptosis se usó un teratoma inducido por la inyección de iPS (Derecha). Barra de escala 100 μ m.

Otra función de c-Raf, independiente de la activación de Mek/Erk, es la inhibición por interacción proteína/proteína de la quinasa Roka (Ehrenreiter et al., 2005). Esta inhibición provoca una desdiferenciación celular en la epidermis. En un modelo de continua activación de Ras se ha visto que la supresión de c-Raf implica la diferenciación de las células tumorales (Ehrenreiter et al., 2009). De esta manera, tal como se hizo en este estudio, miramos los niveles de fosforilación de la Cofilina, una proteína diana de Roka. Al igual que sucedió en el caso de pErk, los niveles basales de células positivas para pCofilina son bastante elevados como para distinguir pequeñas variaciones, y la doble tinción pCofilina/X-gal no resultó satisfactoria.

Nuestro laboratorio demostró que, en un modelo similar ($K-Ras^{lox/LSLG12V}$) el cual simula la pérdida de heterocigosidad, la eliminación de Cdk4 provoca que estas células se vuelvan senescentes evitando el desarrollo de los tumores, así como su progresión (Puyol et al., 2010). Sin embargo, la eliminación de c-Raf no inducía senescencia en las células pulmonares que expresaban K-Ras^{G12V} (Figura 36).

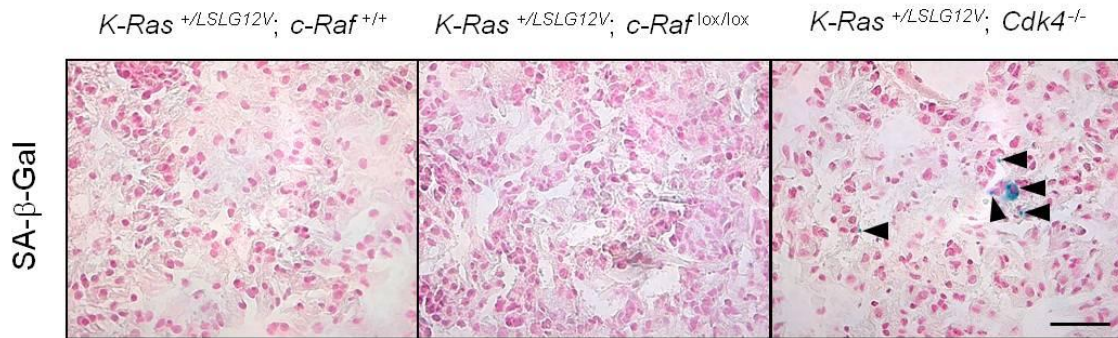


Figura 36. La eliminación de c-Raf no provoca la senescencia de las células pulmonares que expresan K-Ras^{G12V}. Tinción β-gal asociada a senescencia (SA-β-gal) en secciones de parafina de pulmón. Los pulmones se extrajeron de animales *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{+/+}; RERT^{ert/ert}* (Izquierda) y *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* (Medio) que habían sido tratados 30 días antes con adeno-Cre. Como control de senescencia se usaron pulmones de animales *K-Ras^{+/LSLG12V}; Cdk4^{-/-}; RERT^{ert/ert}*, tratados con 4-OH-Tamoxifeno. Las células senescentes son indicadas con puntas de flechas (Derecha). Barra de escala 100 μm.

6.7 La diferente acción de las proteínas Raf, en condiciones de expresión de K-Ras^{G12V}, depende del contexto celular

Debido a que, por dificultades técnicas, fue imposible detectar el mecanismo que impedía que las células que expresaban K-Ras^{G12V}, en ausencia de c-Raf dieran lugar a tumores, tratamos de ver si podíamos elucidar este mecanismo *in vitro*. También había que tener en cuenta que, como se ha expuesto en este trabajo, la eliminación de B-Raf o c-Raf puede tener distintas consecuencias dependiendo del tipo celular. Por tanto, el objetivo era estudiar qué ocurría cuando se expresaba K-Ras^{G12V} y eliminábamos B-Raf, c-Raf o ambas proteínas al mismo tiempo, en MEFs. Si los resultados eran similares a los obtenidos *in vivo*, los MEFs servirían además como modelo de estudio del mecanismo. De esta forma se generaron MEFs con los genotipos *K-Ras^{+/LSLG12V}; RERT^{ert/ert}*, *K-Ras^{+/LSLG12V}; B-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*, *K-Ras^{+/LSLG12V}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*, *K-Ras^{+/LSLG12V}; B-Raf^{lox/lox}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*, y se trataron con 4-OH-tamoxifeno hasta que B-Raf y c-Raf se habían eliminado por completo (**Figura 37**). En la curva de proliferación (**Figura 37**) se observó que tanto la eliminación de c-Raf como la B-Raf tenían resultados equivalentes, provocando en ambos casos una caída en la proliferación. Este efecto equivalente no se veía en el pulmón. De igual manera, la eliminación de ambas proteínas provocaba una reducción en la proliferación en un grado similar a la eliminación de c-Raf o B-Raf por sí solas.

6. Resultados

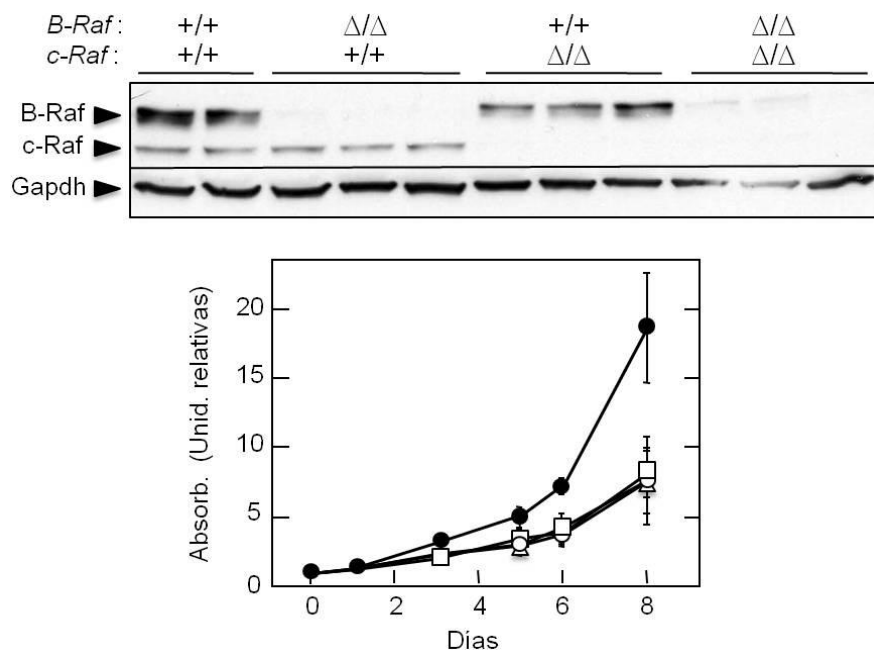


Figura 37. La eliminación de B-Raf y/o c-Raf afecta de igual manera a las células que expresan $K-Ras^{G12V}$. **Panel superior.** Western blot frente a B-Raf y c-Raf, de lisados obtenidos a partir de MEFs primarios. Los MEFs fueron aislados de embriones: $K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}$, $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$, $K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ y $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$. Los MEFs fueron crecidos 5 días en DMEM suplementado con 10% de FBS y 4-OH-tamoxifeno (600nM), para lograr la expresión de $K-Ras^{G12V}$ y al mismo tiempo la eliminación de B-Raf y/o c-Raf. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos aparecen indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha. **Panel inferior.** Curva de proliferación de los MEFs (n=3) descritos arriba. La curva se realizó en DMEM suplementado con 10% de FBS y 4-OH-tamoxifeno (600nM). $K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}$ (círculos negros), $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (cuadrados blancos), $K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (círculos blancos) y $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (triángulos blancos).

Sin embargo, al estar trabajando en condiciones óptimas de factores de crecimiento (DMEM+10%FBS), los efectos del oncogén podrían verse enmascaradas por la acción de otras vías. Se ha demostrado que en condiciones en las que la concentración de FBS se restringe al 2%, sólo crecen aquellas células en las que se expresan formas oncogénicas de K-Ras (Puyol et al., 2010; Tuveson et al., 2004). De esta manera, se hizo una curva de proliferación en estas condiciones y los resultados fueron similares. Solamente lograban proliferar los MEFs en los que no se había eliminado ninguna proteína Raf (**Figura 38**). Por tanto se podía decir que, aunque el oncogén expresado en los MEFs era el mismo que en el epitelio pulmonar, la eliminación de una u otra proteína Raf tenía un efecto equivalente, a diferencia de lo que ocurría en el pulmón.

Sin embargo, el desarrollo de un tumor depende de otros factores además de la proliferación. Por este motivo, también se quiso ver qué papel jugaban las proteínas Raf en la capacidad de immortalización de los MEFs (**Figura 39**). Se ha visto que los MEFs que expresan K-Ras^{G12V} no sufren un período de senescencia replicativa, o si lo sufren es más breve que el período de senescencia replicativa que se observa en los MEFs no oncogénicos (Guerra et al., 2003). En nuestros MEFs vimos que efectivamente, los *K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}* y aquellos en los que se había eliminado B-Raf, crecían sin entrar en senescencia replicativa, y sin embargo aquellos en los que se eliminaba o c-Raf, o B-Raf y c-Raf conjuntamente, sufrían un periodo de senescencia replicativa similar. Aquí c-Raf, sí que parecía tener un papel preponderante sobre B-Raf, indicando que según la función que se estuviera valorando, las distintas proteínas Raf pueden tener mayor o menor importancia.

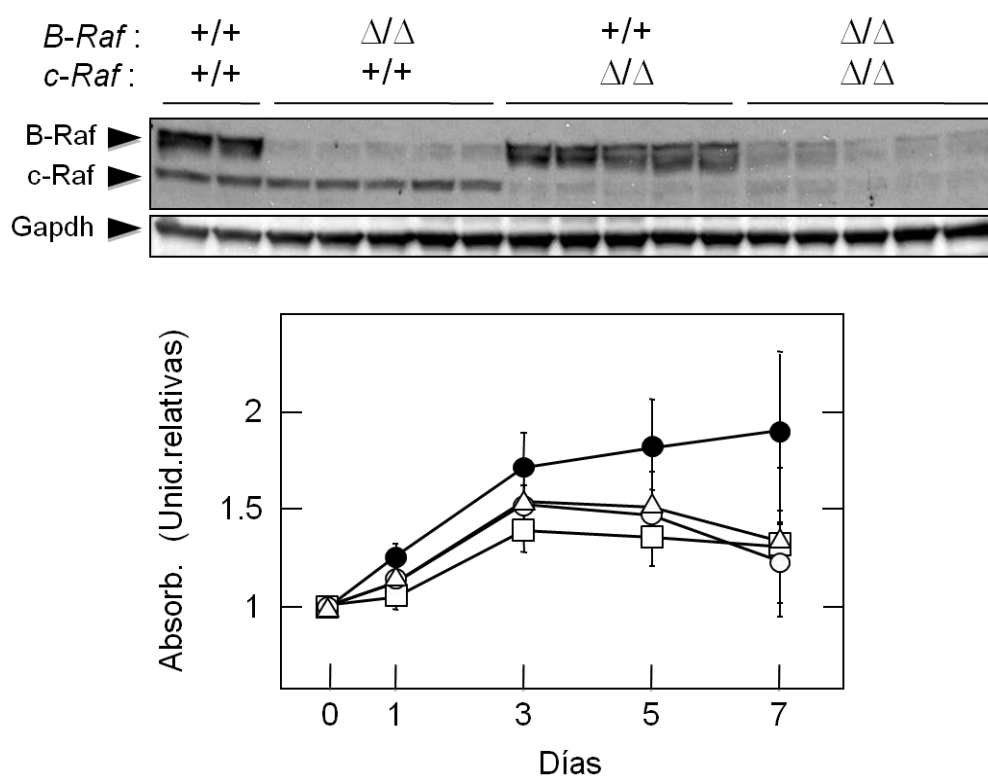


Figura 38. La eliminación de B-Raf y/o c-Raf afecta de igual manera a las células que expresan K-Ras^{G12V}, cuando estas son sometidas a una restricción de suero. **Panel superior.** Western blot frente a B-Raf y c-Raf, de lisados obtenidos a partir de MEFs primarios. Los MEFs fueron aislados de embriones: *K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}*, *K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*, *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* y *K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}*. Los MEFs fueron crecidos 5 días en DMEM suplementado con 2% de FBS y 4-OH-tamoxifeno (600nM), para lograr la expresión de K-Ras^{G12V} y al mismo tiempo la eliminación de B-Raf y/o c-Raf. GAPDH fue empleado como control de carga. Los genotipos aparecen indicados en la figura. La migración de las proteínas es indicada mediante una punta de flecha. **Panel inferior.** Curva de proliferación de los MEFs (n=5) descritos arriba. La curva se realizó en DMEM suplementado con 2% de FBS y 4-OH-tamoxifeno (600nM). *K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}* (círculos negros), *K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (cuadrados blancos), *K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (círculos blancos) y *K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (triángulos blancos).

6. Resultados

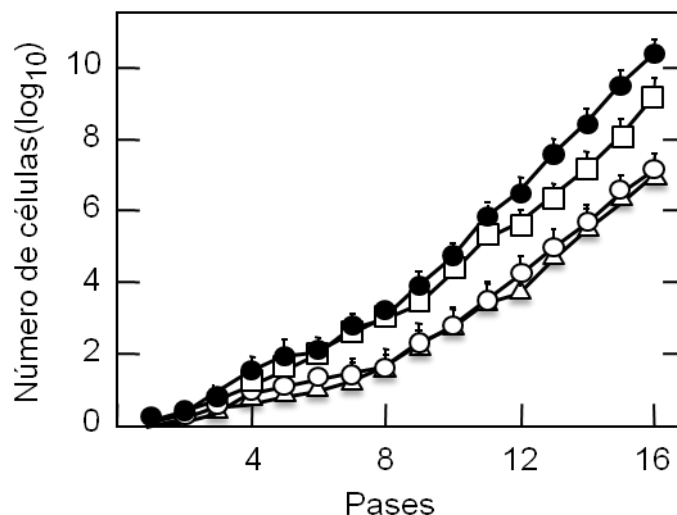


Figura39. La supresión de c-Raf afecta, en mayor medida que la de B-Raf, a la inmortalización de MEFs primarios que expresan $K-Ras^{G12V}$. Curva de inmortalización. Se emplearon los MEFs primarios descritos en la figura 38. Se siguió el clásico protocolo 3T3, empleando DMEN suplementado con un 10%FBS y 4-OH-tamoxifeno (600nM). $K-Ras^{+/LSLG12V};RERT^{ert/ert}$ (círculos negros), $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (cuadrados blancos), $K-Ras^{+/LSLG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (círculos blancos) y $K-Ras^{+/LSLG12V};B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (triángulos blancos).

6.8 Estudio del papel de c-Raf en el mantenimiento y progresión de tumores de pulmón inducidos por $K-Ras^{G12V}$

A pesar de la información generada por los anteriores resultados, si realmente se querían extrapolar a una aproximación terapéutica, era necesario conocer, mediante una aproximación genética, si la eliminación de c-Raf en tumores previamente establecidos provocaba la regresión o bien la estabilización del tumor.

Para hacer esto primero había que resolver una cuestión técnica. Tanto c-Raf (así como los otros modelos condicionales empleados en este estudio) como $K-Ras^{+/LSLG12V}$, empleaban un sistema Cre/loxP. Por tanto, si se quería que la formación del tumor y la eliminación de c-Raf fueran dos sucesos independientes, habría que introducir un sistema de recombinación Flippasa/frt para uno de los loci. Dado que la mayoría de los modelos de expresión condicional existentes en la actualidad son Cre/loxP, se generó un modelo $K-Ras^{+/FSFG12V}$ (Drosten, no publicado) con el objetivo que se pudiera cruzar con aquellos modelos que pudieran ser interesantes, como es el caso de $c-Raf^{lox/lox}$.

Esencialmente este modelo era igual al $K-Ras^{+/LSLG12V}$, pero en lugar de los sitios loxP se colocaron sitios frt flanqueando el casete STOP de transcripción. De esta manera, al infectar los ratones con adenovirus, que portaran el gen de la flippasa, sería esta recombinasa la que eliminaría el casete STOP, el cuál impedía la expresión del oncogén (**Figura 40**). La otra variación de este modelo, frente al

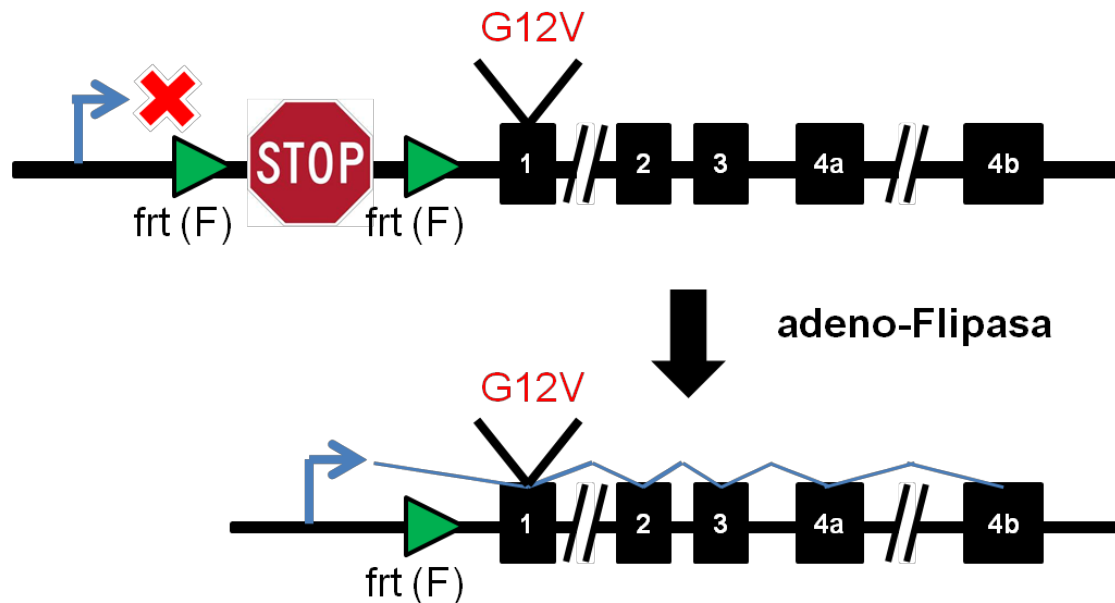


Figura 40. Modelo $K\text{-Ras}^{+/FSFG12V}$. La expresión del oncogén $K\text{-Ras}^{G12V}$ se encuentra bloqueada por un casete STOP de transcripción. La Flipasa reconoce los sitios frt (F), y elimina este casete permitiendo la transcripción del oncogén.

modelo $K\text{-Ras}^{+/LSLG12V}$, es que no existía ningún gen reportero que se expresara al mismo tiempo que $K\text{-Ras}^{G12V}$.

Estos $K\text{-Ras}^{+/FSFG12V}$ se cruzaron con los ratones $B\text{-Raf}^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$, los $c\text{-Raf}^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ y los $B\text{-Raf}^{lox/lox};c\text{-Raf}^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$. Se trataron, con adeno-Flipasa, animales de 8 semanas de edad de las distintas líneas generadas, además de animales controles $K\text{-Ras}^{+/FSFG12V};RERT^{ert/ert}$. Se esperó 3 meses para que los tumores tuvieran un tamaño considerable y pudieran ser detectados con técnicas de imagen. Pasado este tiempo, se analizaron los animales tratados mediante CT (*Computed Tomography*, Tomografía Axial Computerizada).

Aquellos animales en los que se detectó al menos un tumor en el pulmón comenzaron a ser alimentados con pienso que contenía tamoxifeno, con el fin de que se activara la Cre, y se escindiera B-Raf y/o c-Raf. Así, después de haber alimentado durante 30 días a aquellos animales a los que se les habían detectado tumores en el primer CT, se les realizó un segundo CT. Los datos obtenidos hasta ahora son muy preliminares, puesto que no se ha podido seguir la progresión de muchos tumores en diferentes animales. Lo que se puede decir, es que después de un mes de tratamiento no se observó reducción en las dimensiones de ninguno de los tumores analizados, para ninguno de los genotipos (Figura 41).

6. Resultados

Otro de los parámetros que se ha tenido en consideración es aquellos tumores que, debido a su tamaño, no fueron detectados durante el primer CT y sin embargo, debido a su crecimiento, fueron detectados en el segundo CT. Sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas en este parámetro para ninguno de los genotipos analizados (**Figura 41**).

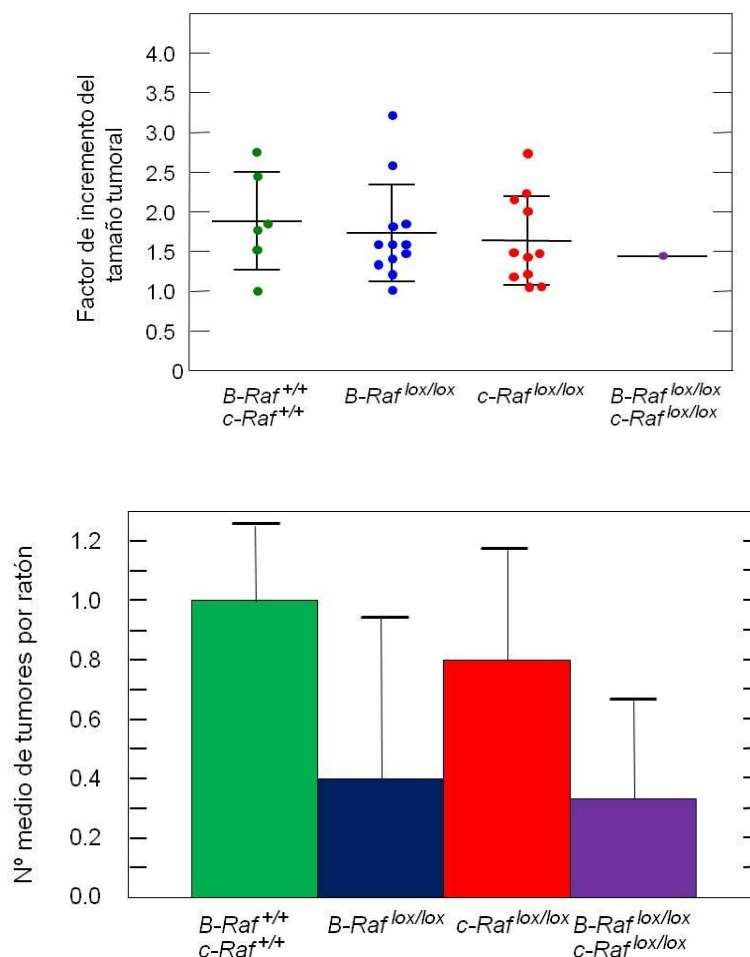


Figura 41. Los tumores de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V} no se ven afectados, en forma alguna, tras 30 días de tratamiento con tamoxifeno, independientemente del genotipo. **Panel superior.** Factor de incremento del tamaño tumoral tras 30 días de tratamiento con tamoxifeno. Animales de los diferentes genotipos fueron tratados con adeno-Flipasa y 3 meses después se les realizó un CT. En aquellos animales en los que se detectaron tumores se realizaron mediciones de los mismos. A estos animales se les puso una dieta que contenía tamoxifeno y 30 días después se les volvió a realizar un CT para medir nuevamente el tamaño de esos tumores. Se calculó el factor de incremento entre los dos puntos para cada tumor. $K-Ras^{+/+}/FSFG12V; B-Raf^{+/+}; c-Raf^{+/+}; RERT^{ert/ert}$ (verde), $K-Ras^{+/+}/FSFG12V; B-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}$ (azul), $K-Ras^{+/+}/FSFG12V; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}$ (rojo) $K-Ras^{+/+}/FSFG12V; B-Raf^{lox/lox}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}$ (violeta). La barra de error representa la desviación estándar, la barra horizontal la media. **Panel inferior.** Nuevos tumores CT positivos tras 30 días de tratamiento con tamoxifeno. En los mismos animales arriba descritos, se cuantificaron aquellos tumores que no se habían identificado 3 meses después de la infección adenoviral, pero sí fueron identificados tras 30 días de tratamiento. Los genotipos son los anteriormente mencionados. La barra de error representa la desviación estándar.

Como se ha contemplado con anterioridad, es posible que la eliminación de c-Raf, a pesar de ser esencial en la iniciación de los tumores, pudiera no jugar un papel muy importante en el mantenimiento de los mismos. Sin embargo, al analizar el DNA genómico de pulmones extraídos de animales *c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}*, tratados durante 30 días con dieta con tamoxifeno, se mostró que la recombinación dentro del locus *c-Raf^{lox}*, era de un 60% (**Figura 42**). Por tanto, fuera necesario o no c-Raf, era muy probable que con esos niveles de escisión de c-Raf en los tumores, no hubiera mayores consecuencias para los mismos.

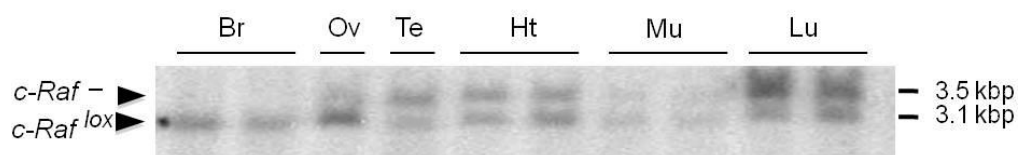


Figura 42. Escisión de c-Raf en diferentes tejidos de animales adultos después de un mes de tratamiento con tamoxifeno. Southern blot a partir de DNA aislado de diferentes tejidos. Los tejidos fueron obtenidos de animales *c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* los cuales habían sido alimentados *ad libitum* con pienso que contenía tamoxifeno. Éstos fueron sacrificados a los 30 días de iniciarse el tratamiento. La digestión del DNA fue realizada con PstI. Los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos *c-Raf^{lox}* y *c-Raf⁻* aparecen en la figura. Los distintos tejidos analizados fueron: Cerebro (Br), Ovario (Ov), Testículo (Te), Corazón (Ht), Músculo Estriado (Mu) y Pulmón (Pu).

Por tanto, los animales se siguieron alimentando con el pienso de tamoxifeno hasta lograr una escisión óptima de c-Raf. Si el número de tumores que hasta el momento se ha analizado, tras 30 días de tratamiento, aún es escaso, este número es aún menor para los animales que se han seguido hasta 60 días. Por tanto, por el momento solo se pueden comentar tendencias, acerca de nuestros resultados.

Así, parece que los tumores en los que se está eliminando c-Raf crecen más lentamente (**Figura 43**) (aunque hay algunos que crecen como los tumores de los controles), y que la eliminación de c-Raf hace que aparezcan menos tumores 60 días después del primer análisis. También hay que mencionar que la dosis de virus elegida fue la adecuada para detectar pocos tumores en el primer CT y poder seguir su progresión. Sin embargo, la aparición de nuevos tumores hace que en algunos animales sea difícil seguir tumores que se tuvieron en cuenta al inicio. Una futura solución sería bajar la dosis de virus, aún a riesgo de no detectar tumores en muchos animales a los 3 meses de iniciarse el tumor.

6. Resultados

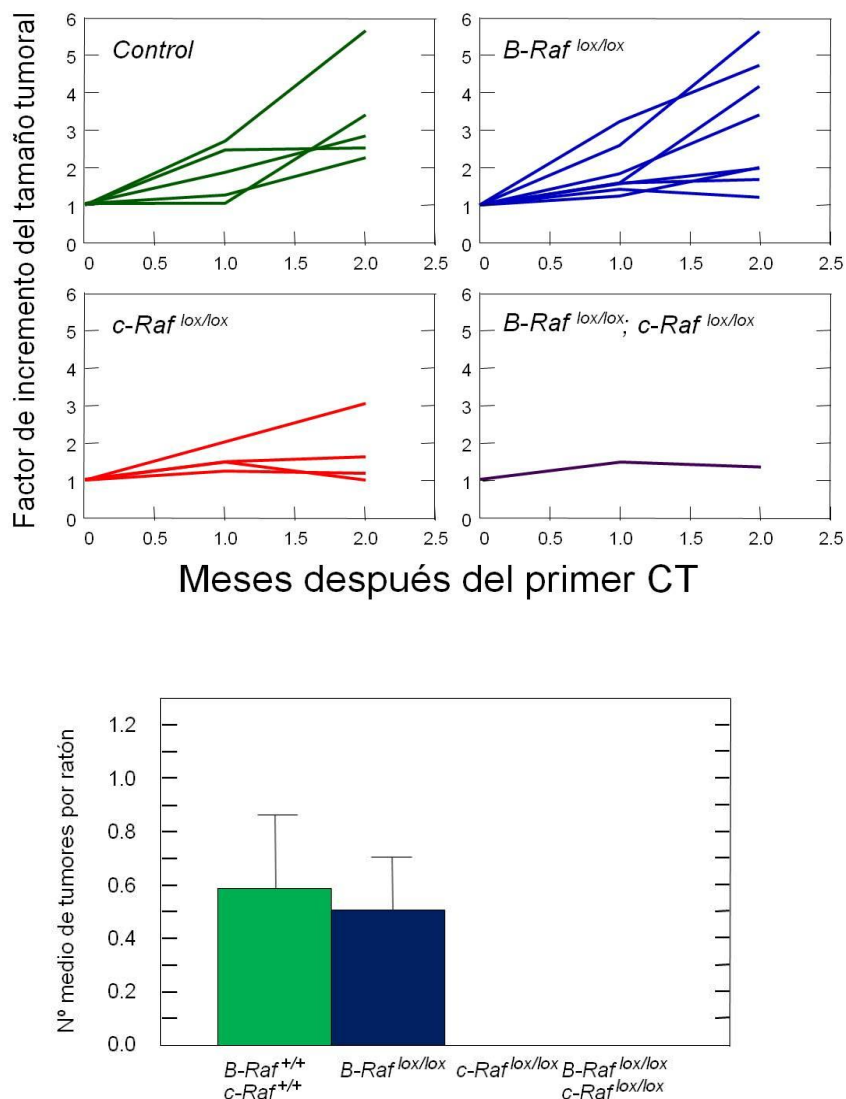


Figura 43. Análisis de los tumores de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V} tras 60 días de tratamiento con tamoxifeno. Panel superior. Progresión del factor de incremento de tamaño tumoral tras el inicio del tratamiento con tamoxifeno. Animales de los diferentes genotipos fueron tratados con adeno-Flipasa y 3 meses después se les realizó un CT. En aquellos animales en los que se detectaron tumores se realizaron mediciones de los mismos. A estos animales se les puso una dieta que contenía tamoxifeno. 30 y 60 días después se les volvió a realizar un CT para medir nuevamente el tamaño de esos tumores. Se calculó el factor de incremento para cada tumor. *K-Ras^{+/FSFG12V};B-Raf^{+/+};c-Raf^{+/+};RERT^{ert/ert}* (verde), *K-Ras^{+/FSFG12V};B-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (azul), *K-Ras^{+/FSFG12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (rojo) *K-Ras^{+/FSFG12V};B-Raf^{lox/lox}; c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* (violeta). Panel inferior. Nuevos tumores CT positivos aparecidos en el período comprendido entre 30 y 60 días de tratamiento con tamoxifeno. Los animales son los mismos arriba descritos. Se cuantificaron aquellos tumores que no se habían identificado 4 meses después de la infección adenoviral (y 30 días después de iniciarse el tratamiento), pero sí fueron identificados tras 60 días de tratamiento. Los genotipos son los anteriormente mencionados. La barra de error representa la desviación estándar.

7. Discusión

7. Discusión

El cáncer de pulmón es, junto a las enfermedades cardiovasculares, una de las principales causas de muerte en los países occidentales. A pesar de ello no ha habido grandes avances en el tratamiento del cáncer de pulmón siendo la cirugía, siempre y cuando el tumor sea operable, la solución que más puede incrementar la esperanza de vida de los pacientes. Cuando esto no es posible, se suele recurrir a la radioterapia, y cuando hay focos metastáticos a diferentes protocolos de quimioterapia, usando compuestos como taxol y sus derivados. En algunas ocasiones, cuando se identifican alteraciones en el RTK *EGFR*, se suele tratar, a modo paliativo, con erlotinib (un inhibidor de la actividad quinasa de este receptor). *K-RAS* es uno de los genes más frecuentemente mutado en adenocarcinoma de pulmón (Travis et al., 2004), además de encontrarse, dicha mutación, implicada en el desarrollo inicial del tumor (Meuwissen y Berns, 2005). Por ello, se han generado diversos modelos de ratón que tratan de recapitular la enfermedad humana. Estos se basan en la inducción de la expresión de formas mutadas de *K-Ras* frecuentemente encontradas en tumores humanos, en algunas células del epitelio pulmonar y bajo el control del propio promotor de *K-Ras* (Guerra et al., 2003; Jackson et al., 2001). A pesar de que estos modelos no recapitulan todos los procesos de la enfermedad humana, ya que los animales no presentan metástasis, evitan ciertos problemas que presentaban algunos modelos clásicos (niveles suprafisiológicos de proteínas en los transgénicos clásicos o ausencia del entorno propio del tumor en los tumores xenotransplantados). Estos modelos no sirven sólo para estudiar el desarrollo de la enfermedad, sino que además sirven como modelos en la búsqueda de proteínas importantes en el desarrollo o mantenimiento de los tumores. Dada las dificultades técnicas para inhibir directamente *K-Ras*, se ha decidido buscar inhibir la señal de *Ras* a través de sus vías efectoras. Así, empleando estos modelos, se han hecho diversos estudios de supresión tumoral inhibiendo o afectando a la expresión de *Cdk4* (Puyol et al., 2010), inhibiendo *Myc* (Soucek et al., 2008) o inhibiendo la señalización de la vía *NF-κB* (Meylan et al., 2009).

Este trabajo se centró en actuar sobre la vía *Erk-Mapk*, la cual interviene en procesos que deberían ser esenciales para el desarrollo del tumor. Así, mediante una aproximación genética, se estudió qué papel juega cada uno de los miembros de esta vía en el desarrollo del tumor y cuáles de ellos podrían tener implicaciones terapéuticas. Además, todos los miembros de esta vía son quinasas, enzimas contra las que teóricamente es más asequible desarrollar moléculas inhibidoras.

7.1 El papel esencial de las proteínas *Erk*: Desarrollo del tumor frente a su necesidad para la homeostasis del animal

Como se ha visto en este estudio, la eliminación de *Erk1* o *Erk2* no impide el desarrollo del tumor. Es cierto que en los animales, cuyos tumores crecen sin *Erk1* o *Erk2*, se produce un pequeño

incremento porcentual en su esperanza de vida. Teniendo en cuenta que es un estudio de eliminación completa de la proteína, y no un estudio de inhibidores, y que el número de tumores no se veía reducido de forma significativa cuando eliminábamos Erk1 o Erk2, este incremento en la esperanza de vida se podría considerar como despreciable. Estos resultados serían contrarios a lo observado en un trabajo de inducción de tumores, mediante la inyección de células de hepatocarcinoma, en ratones inmunocomprometidos (Bessard et al., 2008). En este estudio la inhibición de Erk2, mediante RNAi, provocaba una reducción en la progresión del tumor, al inhibir la entrada en fase S. Por tanto, en este contexto, Erk1 y Erk2 no serían funcionalmente redundantes. A pesar de que Erk1 y Erk2 son dos proteínas con una alta homología, se ha visto que en el desarrollo embrionario Erk2 juega un papel esencial en el desarrollo de la placenta, y concretamente en su vascularización (Hatano et al., 2003; Saba-El-Leil et al., 2003; Yao et al., 2003), mientras que Erk1 es dispensable (Pages et al., 1999). Una posible razón es que estas proteínas tuvieran diferentes niveles de expresión en células claves para el desarrollo de la placenta. La existencia de proteínas *scaffold* que interaccionaran con una isoforma u otra, también podría explicar este fenómeno. Estos resultados, en placenta y xenotransplante de hepatocarcinoma, indican que, en ciertos sistemas, las dos isoformas de Erk tendrían distinta importancia en la señalización de la vía. Habría pues que comprobar si esta situación de diferencia de funciones, entre Erk1 y Erk2, se daba también en tumores de pulmón. Sin embargo, nuestro trabajo ha mostrado, a través de los niveles de fosforilación de p90RSK, que las dos isoformas se compensan mutuamente en tumores de pulmón inducidos por K-Ras^{G12V}. Es decir, en nuestro sistema la razón por la cual hay tumores en ausencia de Erk1 o Erk2, es porque la isoforma que permanece es capaz de transmitir la señalización. Conectando con esto, hay algunos estudios que sostienen que Erk1 y Erk2 son iguales en función, y que lo importante es alcanzar un umbral de señalización, independientemente de cuál sea la proteína que más contribuye a este hecho (Lefloch et al., 2008). Nuestros resultados muestran que en ausencia de Erk2, los niveles de pErk1 se encuentran más elevados, por lo que el sistema de compensación sería simplemente aumentar los niveles de fosforilación de Erk1, para alcanzar ese supuesto umbral. Sin embargo, en ausencia de Erk1, los niveles de pErk2 se encuentran en su nivel basal, por lo que estos niveles serían más que suficientes para alcanzar ese umbral. Lógicamente es demasiado arriesgado obtener conclusiones a este respecto, puesto que no se han analizado muchos tumores. Este riesgo es mayor si tenemos en cuenta la variación de pErk observada en todo el trabajo entre tumores del mismo genotipo.

Esa redundancia funcional quedó demostrada cuando ambas isoformas fueron eliminadas al mismo tiempo. En esta situación solo se desarrollaban un 10% de tumores en comparación con los ratones silvestres. Además, estos tumores se desarrollaban a partir de células en las que la Cre activaba la expresión de K-Ras^{G12V}, sin cortar uno o ambos alelos *Erk2* flanqueados por sitios *lox*. Es decir, no existían tumores que carecieran de ambas isoformas Erk, siendo por tanto esencial la presencia de al menos una de ellas.

7. Discusión

En los estudios que mostraban la necesidad de interacción entre K-Ras y PI3K, demostrando la importancia de PI3K en el desarrollo de adenocarcinomas de pulmón (Engelman et al., 2008; Gupta et al., 2007), había un porcentaje muy reducido de lesiones tumorales. Además estas eran de un tamaño muy inferior a las encontradas en animales en los que la interacción entre Ras y PI3K no se encontraba alterada. Se comprobó que estas lesiones no presentaban activación de Akt, lo que implicaba una inactivación de la vía. Así se demostró que estos tumores podían desarrollarse en ausencia de la vía PI3K, aunque el crecimiento de los mismos se veía afectado. Estos datos indican que la inhibición de Erk podría ser más eficaz en el bloqueo de tumores promovidos por formas oncogénicas de K-Ras, pues no hay tumores que crezcan en ausencia de Erk.

Esta dependencia por Erk1/2, que presentaban los tumores en su desarrollo, podría no tener implicaciones terapéuticas, es decir, puede que los tumores una vez establecidos no requieran la señalización de Erk. Esto no pudo ser validado ya que la eliminación sistémica de Erk1/2 resultaba incompatible con la homeostasis del animal. Estudios previos en los que Erk1/2 se había eliminado en tejidos adultos, mostraban que la presencia de al menos una proteína Erk era necesaria para la correcta maduración de los linfocitos T (Fischer et al., 2005), así como para la ovulación (Fan et al., 2009). Sin embargo, son defectos con los que los animales, en condiciones idóneas de estabulación, pueden vivir sin problemas. En nuestros resultados, hemos visto que se presentaban algunas alteraciones en órganos con alta tasa de renovación. Así, la lengua presentaba ulceraciones, debido al daño de su epitelio, y también existían anormalidades intestinales (datos no mostrados). A su vez, se observó algún defecto en la secreción de enzimas pancreáticas (datos no mostrados), que pudiera conllevar problemas en la digestión. Puede que la acumulación de estos defectos en diversos órganos, quizá sin consecuencias si se dieran de forma aislada, llevara a la muerte del animal. Así por ejemplo, si a la existencia de anormalidades en el intestino y el páncreas, le sumamos las dificultades que estos animales presentaban al comer (debido a las ulceraciones de la lengua), podrían explicar la fuerte pérdida de peso y muerte del animal. Los animales morían antes de lograrse escisiones importantes de Erk2. Esto explicaba que en ningún tejido se viera una alteración dramática de la histología, especialmente aquellos en los que por su alta tasa de proliferación, deberían haberse visto más afectados.

A pesar de que este resultado impedía la realización de la aproximación terapéutica, antes mencionada, nos ofrecía una valiosa información, la esencialidad de esta vía en la homeostasis del animal adulto. Es arriesgado comparar los resultados genéticos con resultados de inhibidores. Así, no es lo mismo que todos los monómeros o homodímeros de Erk estén funcionando al 50% en todas las células (como pudiera ocurrir con un tratamiento con inhibidores), que solo el 50% de las células tenga Erk, como hemos visto en mucho de los órganos analizados (aproximación genética). Mencionando esta importante salvedad, al menos se pone de manifiesto que muchos órganos podrían verse afectados, y que por tanto

el uso de inhibidores debe de establecer un difícil equilibrio entre el potencial terapéutico y los efectos secundarios masivos.

7.2 Las proteínas Mek: El balance entre la esencialidad para el tumor y los posibles problemas emergentes de su uso terapéutico

De similar forma a como ocurría con las isoformas Erk, la ausencia de Mek1 o Mek2 no tenía consecuencia en el desarrollo de los tumores. Estos resultados se oponen a los obtenidos en carcinogénesis química (DMBA+TPA) en la epidermis, donde Mek2 no puede compensar la ausencia de Mek1 en el desarrollo de papilomas, siendo más reducidos los papilomas cuando Mek1 no se encontraba presente (Scholl et al., 2009b). También se ha visto que Mek1 activado puede inducir hiperplasia y proliferación epitelial, pero no se logra con una forma de Mek2 activada (Scholl et al., 2004). Hay muchos estudios que debaten sobre la redundancia funcional Mek1/Mek2. Ambas isoformas tienen una única diana, Erk, y tienen una gran homología, sin embargo, el hecho de que en el desarrollo de la placenta Mek1 tenga un papel esencial, que no puede compensar Mek2, (Bissonauth et al., 2006; Giroux et al., 1999) ha hecho buscar mecanismos moleculares que puedan explicar porque hay situaciones en los que no existe redundancia funcional. Así, se ha visto que hay proteínas *scaffold* que sólo asocian Mek1 con las proteínas Erk (Roy et al., 2005; Schaeffer et al., 1998; Yin et al., 2004), por lo que esto podría implicar que en ciertas funciones celulares es solo Mek1 el que transmite la señal a Erk. En este sentido, recientemente se ha propuesto un modelo en el que Mek2 se encontraría subrogado al control de Mek1 en conformaciones heterodiméricas, observándose alteraciones en la fosforilación de Erk cuando Mek1 está ausente (Catalanotti et al., 2009). Sin embargo, en nuestro estudio se ha visto que el patrón de fosforilación de Erk no cambia en ausencia de Mek1. Además, en el mencionado trabajo de carcinogénesis epitelial, en el que Mek1 tiene un rol preponderante (Scholl et al., 2009b), la ausencia de Mek1 no implicaba alteraciones en la fosforilación de Erk. Por tanto, aunque hay estudios que demuestran que en determinadas circunstancias pueden tener papeles distintos, en nuestro modelo de adenocarcinoma parece ser que ocurre algo similar a lo que ocurría en la ausencia de una sola isoforma de Erk. Así, ambas isoformas muestran un papel redundante en la activación de Erk, llegando por sí solas al umbral necesario de señalización.

Cuando ambas, Mek1/2, fueron eliminadas no aparecían tumores, asumiéndose que era la ausencia de señalización de la vía la responsable de que éstos no se desarrollaran. Este resultado se puede explicar por el hecho que Erk es la única diana de Mek, y por tanto la ausencia de ambas proteínas Mek tenía las mismas consecuencias que la eliminación de ambas proteínas Erk. También, como ocurría

7. Discusión

para el caso de Erk, los escasos tumores que crecían lo hacían por un fallo en la recombinación de uno o ambos alelos de Mek1. Esto coincide con otras aproximaciones genéticas, en los que la ausencia de Mek1/2 bloqueaba procesos hiperplásicos epiteliales inducidos por la sobreexpresión de H-Ras^{G12V} y Raf activado (Scholl et al., 2009a; Scholl et al., 2007). Parece por tanto que esta supresión del desarrollo tumoral no es específica de tejido, sino que parece afectar a un mecanismo general necesario para el desarrollo de los tumores. Así, se pensó que era interesante comprobar su papel en la progresión y mantenimiento tumoral. Desafortunadamente la eliminación sistémica de las proteínas Mek causaba daños en el organismo, especialmente en el intestino delgado y en el colon, con la consecuente muerte de los animales. Esta afectación de dos órganos con alta tasa de proliferación está de acuerdo con el hecho de que la vía Erk-Mapk es, de todas las vías que activa Ras, la más importante en proliferación (Drosten et al., 2010). De hecho, en un estudio de eliminación de Mek1/2 en epidermis, otro tejido con alta tasa de renovación, los animales morían por alteraciones en la piel y lengua (probablemente también en el esófago) observándose un incremento de la apoptosis por vía mitocondrial, e hipoplasia (Scholl et al., 2007).

Muchos de los fármacos inhibidores de Mek que se han ensayado en la actualidad en NSCLC, como CI-1040 (o PD384152), AZD6244 (o ARRY-142886) y el PD0325901, han fallado en su papel antitumoral (Hainsworth et al., 2010; Haura et al., 2010; Rinehart et al., 2004). Como se dijo en el epígrafe anterior, una aproximación genética no es equivalente a una inhibición por fármacos, pero probablemente algunos de los fármacos hayan fracasado porque las concentraciones a las cuales el fármaco muestra una capacidad antitumoral manifiesta, supondrían toxicidad en el tejido normal.

En cualquier caso, sería interesante ver cómo afecta la supresión de 3 de los cuatro alelos de Mek, a un tumor ya establecido (siempre por inducción de la expresión de K-Ras^{G12V}), mediante los animales *Mek1^{+/-lox}; Mek2^{-/-}; RERT^{ert/ert}* y *Mek1^{lox/lox}; Mek2^{+/-}; RERT^{ert/ert}*. Hay un estudio que demuestra que la hiperplasia epitelial es dependiente de la dosis alélica (Scholl et al., 2009a). Así, cuando sólo queda uno de los cuatro alelos Mek, esto es suficiente para mantener la homeostasis de la piel, pero afecta al desarrollo de estas hiperplasias. En nuestro caso, hemos visto resultados preliminares en los que la existencia de un solo alelo Erk es suficiente para la homeostasis. Por otro lado, los tumores parece que podrían crecer con un solo alelo Mek, puesto que se han visto tumores de animales *K-Ras^{+/-LSLG12V}; Mek1^{lox/lox}; Mek2^{-/-}; RERT^{ert/ert}*, en los que hay un 50% de escisión de *Mek1^{lox}* (lo que se podría interpretar como una situación *Mek1^{+/-}; Mek2^{-/-}*). Futuros experimentos deberían demostrar si un solo alelo Mek2 sería suficiente para la homeostasis y el desarrollo de los tumores de pulmón.

7.3 La esencialidad de c-Raf en NSCLC frente a la dispensabilidad de B-Raf

Este trabajo ha mostrado que la supresión de B-Raf no impide el desarrollo de los tumores inducidos por la expresión de K-Ras^{G12V}, demostrándose por tres aproximaciones diferentes (*western blot*, inmunohistoquímica y *southern blot*), a nivel de DNA y de proteína, que B-Raf no se expresaba en estos tumores. Tradicionalmente se ha considerado que B-Raf es, de todas las proteínas Raf, el principal activador de Mek, como se ha demostrado en ensayos *in vitro* y en MEFs *B-Raf*^{-/-}, además de ser la proteína Raf de mamíferos que mayor homología presenta con las equivalentes de organismos menos complejos (invertebrados) (Revisado por Galabova-Kovacs et al., 2006a; Niauxt y Baccarini, 2010). Adicionalmente, su activación, una vez Ras se encuentra activado, es mucho más rápida que la de A-Raf y c-Raf. Esto último se debe a que, como ha sido mencionado en la introducción, para que estas proteínas sean activas tiene que producirse, entre otros eventos, una acumulación de cargas negativas en el extremo N-terminal del dominio catalítico. En A-Raf y c-Raf esto se consigue mediante la fosforilación de dos residuos, sin embargo en B-Raf hay, en posiciones equivalentes, un aspártico y una serina permanentemente fosforilada (Revisado por Galabova-Kovacs et al., 2006a; Niauxt y Baccarini, 2010). Así, toda esta información implicaría que, en ausencia de B-Raf, la activación de Mek debería ser menor y los tumores tendrían más dificultades para desarrollarse (previamente hemos demostrado que la señalización de pMek-pErk es absolutamente esencial para el crecimiento de estos tumores). Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de pErk en los tumores en los que se había demostrado ausencia de B-Raf, estos se encontraban al mismo nivel que en los tumores con B-Raf. Una posible explicación es que B-Raf no intervenga en la transmisión de la señal en los tumores. Otra explicación sería que B-Raf estuviera implicado en el desarrollo de los tumores, pero su ausencia podría ser compensada por las otras dos proteínas Raf, A-Raf y c-Raf, y de esta forma mantenerse la señalización de la vía.

Sin embargo, la posible hipótesis de la mutua compensación entre las distintas quinasas Raf quedaba desechada al observarse que en los animales, en los cuales se inducía la expresión del oncogén K-Ras^{G12V} a la misma vez que se eliminaba c-Raf, había una reducción del número de tumores (un 90% menos). Así, la esperanza de vida de éstos se veía duplicada con respecto a sus controles. Si además, se tenía en cuenta que los escasos tumores, los cuales se desarrollaban en estos animales, mantenían c-Raf, se podía decir que c-Raf es esencial para el desarrollo de estos tumores. Entonces la pregunta era evidente: ¿por qué B-Raf (la quinasa Raf supuestamente principal responsable de la señalización de Ras) puede ser compensada por c-Raf y A-Raf, pero sin embargo, la ausencia de c-Raf no puede ser compensada por ninguna otra quinasa Raf? En este punto se podrían plantear dos hipótesis principales (**Figura 44**). La primera es que las proteínas Raf se pueden compensar entre sí en la activación de Mek, sin embargo las funciones independientes a ésta, que posee c-Raf y que podrían

7. Discusión

promover el desarrollo tumoral, no serían compensadas por B-Raf y/o A-Raf. Según esta hipótesis, el fenotipo observado sería el mismo al observado en ausencia de Mek1/2 o Erk1/2, pero causado por el bloqueo de una vía diferente a la vía Erk-Mapk. La segunda hipótesis se basaría en que c-Raf es, dentro del contexto de expresión de K-Ras^{G12V} y adenocarcinoma de pulmón, la principal quinasa Raf en la activación de Mek. Según esta hipótesis la eliminación de c-Raf provocaría una caída de la activación de Mek por debajo del umbral requerido, y por tanto obtendríamos un resultado similar al observado cuando Erk1/2 o Mek1/2 no estaban presentes. Por tanto, era clave conocer si había una variación en los niveles de pErk cuando eliminábamos c-Raf. La esencialidad de c-Raf como activador de Mek, y concomitantemente de Erk, no pudo ser probada en nuestro estudio. Esto fue debido primero a que no había tumores (sin c-Raf) en los que poder valorar esto último. Además a tiempos tempranos, los niveles basales del número de células que tenían fosforilado Erk, eran lo suficientemente altos como para no poder detectar las pequeñas variaciones que se originarían por la pérdida de c-Raf en algunas células. La otra aproximación, detectar células dobles positivas para pErk y β -gal (y que por tanto expresaran K-Ras^{G12V}), no pudo realizarse por problemas técnicos. Por tanto, a pesar de todo ello, se pasaron a valorar las dos hipótesis previamente descritas.

Hipótesis 1. La eliminación de c-Raf afecta al desarrollo del tumor en una forma independiente de Mek

Esta hipótesis, en que c-Raf es esencial debido a funciones distintas a las de su actividad como quinasa de Mek, se ha visto en líneas celulares de tumores de pulmón humano con mutaciones en K-RAS (Takezawa et al., 2009). Cuando se eliminaba la expresión de c-RAF en estas células, mediante shRNA, la proliferación celular se veía afectada, pero no la activación de Mek. Por tanto, habría una regulación de la proliferación celular en una forma independiente de Mek. Una posible explicación para esta regulación podría ser la acción de c-Raf sobre Rb. Como se ha mencionado anteriormente, c-Raf forma complejos con Rb y lo fosforila en los promotores E2F1. Aunque esta fosforilación no libera a Rb de dichos promotores, favorecería la posterior acción de los complejos ciclina-Cdk (Dasgupta et al., 2004). Además, la formación del complejo Rb: c-Raf coincide con la liberación de una proteína modificadora de la cromatina, Brg1. Todo ello ayuda a que se transcriban los promotores del programa E2F, necesario para la transición G1/S del ciclo celular. A favor de esto estaría que se ha visto un incremento de complejos c-RAF: RB en NSCLC humano (Dasgupta et al., 2006). La importancia de estos complejos en nuestro modelo podría ser valorada de distintas formas. Una posibilidad sería comparar los niveles de los complejos c-Raf: Rb en los tumores de pulmón que expresan K-Ras^{G12V}, con los encontrados en otros tipos de tumores en los que Ras no se encuentre activo. Otra posibilidad sería el diseño de péptidos que rompieran el complejo c-Raf: Rb, como ya se ha hecho en otros estudios (Kinkade et al., 2008). Si esta unión es esencial para el desarrollo de los tumores, el efecto debería ser el mismo que el observado al eliminar c-Raf.

Otra de las funciones que c-Raf realiza, en una forma independiente de Mek, es la estimulación de la supervivencia celular. La ausencia de c-Raf provoca un incremento de apoptosis en tejidos embrionarios (Wojnowski et al., 1998), de manera específica en el hígado fetal (Mikula et al., 2001), así como la eliminación específica de c-Raf en el corazón provoca un incremento de apoptosis en los cardiomiocitos (Yamaguchi et al., 2004). La relación entre c-Raf y supervivencia se ha caracterizado molecularmente por su interacción directa con proteínas como Ask1 (Chen et al., 2001), que interviene en la muerte inducida por estrés celular, o Mst2 (O'Neill et al., 2004), proteína que provoca la muerte celular a través de Lats1/Yap1. La inhibición de otras proteínas proapoptóticas se ha descrito previamente en este trabajo. En principio podría pensarse que la muerte por apoptosis no era la causa de que las células que expresaban K-Ras^{G12V}, en ausencia de c-Raf, no dieran lugar a tumores, pues el número de células β -gal positivas se mantenía entre los días 15 y 30 posteriores al tratamiento de estos animales. Por el contrario, esta observación no tenía en cuenta el hecho de que algunas células “escapan” de la escisión de c-Raf y podrían compensar la pérdida celular originada en el caso de que hubiera apoptosis. En cualquier caso, se decidió valorar la activación de la caspasa 3, caspasa ejecutora en la que confluyen las diversas vías de apoptosis cuya acción es bloqueada por c-Raf. Debido a que la apoptosis es un fenómeno que transcurre en una ventana de tiempo relativamente corto, se analizó la presencia de caspasa 3 activada cada día después del 5º día, día en el cuál se calculaba que la Cre había llegado a su máxima expresión. No se detectó apoptosis en ninguno de los puntos analizados. En todo caso, la observación de apoptosis tampoco habría podido descartar la intervención de la vía Erk-Mapk, puesto que se sabe que también tiene un papel en la supervivencia celular.

Otra vía, en la que se ha descrito una influencia de c-Raf, es la acción inhibitoria de c-Raf sobre Roka (Pritchard et al., 2004). En condiciones en las que c-Raf se encuentra inhibido o se encuentra ausente, Roka no es inhibido y puede promover la diferenciación de las células epiteliales. Así, se ha demostrado que en modelos de tumores de piel, en los cuales se encuentra activado Ras, c-Raf se encuentra activo y suprime la diferenciación de las células tumorales promoviendo su proliferación (Ehrenreiter et al., 2009). Cuando c-Raf era eliminado de estos tumores las células se diferenciaban, y se encontraba, dentro del tumor, un incremento en los niveles de pCofilina, un conocido efector de Roka. Se intentó evaluar la vía de Roka, por si se encontrara alterada y esta alteración pudiera también estar relacionada con el fenotipo oncogénico, ya que las células pulmonares también tienen naturaleza epitelial. Desafortunadamente, al igual que ocurría con pErk, los niveles basales, del número de células que tienen fosforilada la Cofilina, eran demasiado elevados como para detectar las pequeñas variaciones que pudieran ser causadas por la pérdida de c-Raf en algunas células.

En melanocitos también se ha descrito que c-Raf bloquea la diferenciación (Dumaz et al., 2006). Los melanocitos son células que solo proliferan bajo específicas circunstancias ambientales. En estas células los niveles de AMPc son elevados, haciendo que PKA se active y fosforile residuos inhibitorios de

7. Discusión

c-Raf y este no se pueda unir a Ras. El AMPc está asociado a diferenciación porque estimula procesos como la síntesis de melanina. Sin embargo, en las líneas de melanoma con *RAS* mutado, se encuentran alteraciones en los niveles de AMPc y es c-RAF, y no B-RAF, el responsable de la actividad oncogénica de RAS y de que los melanocitos pierdan sus características propias. En el caso de los adenocarcinomas de pulmón, las células exhiben el marcador SPC, característico de los pneumocitos tipo II. Existe bastante controversia sobre las células troncales (*stem cells*) que dan lugar a las distintas estirpes celulares del pulmón. Un trabajo (Kim et al., 2005) sostiene que las células tumorales provendrían de los denominados BASC (*Bronchio Alveolar Stem Cells*), células que expresarían los marcadores SPC y CC10, y que darían lugar a Células Clara (CC10+) y pneumocitos tipo II (SPC+). Sin embargo, los resultados de nuestro laboratorio (S. Mainardi, comunicación personal) muestran que, no está tan claro que estas células dobles positivas sean aquellas a partir de las cuales se desarrolla el tumor. Sin conocer las células a partir de las cuales se desarrolla el tumor, no se puede conocer si c-Raf tiene un papel de bloqueo de la diferenciación celular en el pulmón.

Hipótesis 2. La eliminación de c-Raf afecta a la activación de la vía Erk-Mapk, en este contexto celular y oncogénico, y concomitantemente al desarrollo de tumor

En las 5 líneas celulares de melanoma que poseían mutaciones en *RAS*, de las que anteriormente se ha hablado, la supresión de c-RAF provocaba la disminución de los niveles de pMek (Dumaz et al., 2006). Esto indicaba que quizá el bloqueo de la diferenciación celular venía dado por la activación de la vía Erk-Mapk. Sin embargo, en estas líneas la supresión de B-RAF no afectaba a la activación de la vía. Por otro lado, en aquellas líneas de melanoma que poseían mutaciones en *B-RAF* (mutaciones activadoras), o líneas en las que *RAS* y *RAF* fueran silvestres, era la supresión de B-RAF la que provocaba la caída de la activación de MEK. Esto hacía pensar que, por alguna razón, la célula cuando recibe una señal oncogénica de Ras pasa de usar B-Raf, como activador de la señal de Mek, a usar c-Raf, como si se tratara de un interruptor. Otros trabajos del mismo laboratorio y de otros independientes apoyan esta hipótesis (Hatzivassiliou et al., 2010; Heidorn et al., 2010; Poulikakos et al., 2010). Las razones o mecanismos que explican este proceso nos son aún desconocidas, pero habría varias hipótesis que podrían más o menos encajar, con algunas salvedades, con los conocimientos que actualmente se tienen y que podrían aplicarse a nuestro modelo.

Si se compara el modelo de expresión de B-Raf^{V600E} y el K-Ras^{G12V}, cuando se activa la expresión del oncogén *B-Raf*^{V600E} (Dankort et al., 2007), por inoculación de adeno-Cre en las vías respiratorias, en el epitelio pulmonar también se activaba la proliferación celular, como ocurre cuando se expresa K-Ras^{G12V}. Sin embargo, en este modelo no se desarrollaban adenocarcinomas, solamente adenomas benignos que presentaban marcadores de senescencia. También se ha visto que los MEFs primarios que expresan B-Raf^{V600E}, en comparación con los que expresan K-Ras^{G12V}, se transforman y tienen mayor proliferación (Mercer et al., 2005). Es decir, parece que la señal transmitida por la forma

oncogénica de B-Raf es mucho más intensa que la transmitida por K-Ras^{G12V}, y eso, *in vivo*, acaba provocando una parada de ciclo celular. Por tanto, es una posibilidad que la señal de K-Ras^{G12V}, transmitida a través de B-Raf, provocara una parada de ciclo celular y estas células no dieran lugar a tumores. Así, el que haya células que dan lugar a tumores sería debido a que activan c-Raf en lugar de B-Raf, cuyo potencial de quinasas es mucho menor y su señalización no provocaría senescencia. De esta manera, al eliminar c-Raf podría ocurrir que las células volvieran a utilizar B-Raf para transmitir la señal oncogénica y estas no dieran lugar a tumores porque serían senescentes. En este trabajo no se han detectado células senescentes, a diferentes tiempos (empleando una tinción β -gal asociada a senescencia), después de activar la expresión del oncogén con escisión simultánea de c-Raf. Hay que tener en cuenta que los adenomas, desarrollados en el modelo de B-Raf^{V600E}, eran también negativos para la tinción β -gal asociada a senescencia, pero presentaban otros marcadores de senescencia. Sin embargo, el hecho de que en nuestro modelo no hubiera los adenomas que hay en el modelo de B-Raf^{V600E}, en ausencia de c-Raf, hacían que esta hipótesis debiera de ser descartada.

Algo más factible, pero siguiendo la línea de la hipótesis del “interruptor” c-Raf/B-Raf, es que la propia señal oncogénica de Ras indujera de alguna manera la inactivación de B-Raf, como parte de un mecanismo que tratara de salvaguardar a la célula de un exceso de señalización, y acabara activando c-Raf, para transmitir la señal a través de la vía Erk-Mapk. De esta manera, al eliminar c-Raf la señalización de esta vía, esencial para que se desarrollen los adenomas y adenocarcinomas de pulmón, quedaría interrumpida. Según esto, las células no podrían proliferar y no darían lugar al tumor.

En este sentido, habría que volver a comparar las situaciones que nos encontramos cuando la señal oncogénica proviene de B-Raf o cuando proviene de K-Ras. Mientras que B-Raf sólo activa Mek, K-Ras media la activación de las otras proteínas Raf y de otros muchos efectores (mencionados en la introducción). Algunos de estos efectores han mostrado regular negativamente la señal de K-Ras, como RIN1. Por tanto, podría haber algún efector que inactivara B-Raf en situaciones en las que la señalización fuera demasiado intensa. También se ha propuesto que se produjera una autoinhibición de B-Raf (Heidorn et al., 2010). Otra posibilidad es que la señal de la vía, a través de B-Raf, originara una señal muy intensa que desencadenara un mecanismo de retroalimentación negativo, por el cual B-Raf fuera inactivado. Así, se ha descrito que pErk fosforila a B-Raf en 4 residuos (S151, T401, S750 y T753) (Ritt et al., 2009). La fosforilación del primero de ellos afecta a la interacción con Ras, el papel de los otros no está aún demasiado claro. En cualquier caso, la fosforilación de cada uno de estos residuos implica un descenso en la actividad de B-Raf, pudiendo ser estos efectos aditivos. A pesar de esto, esta posible explicación tendría un gran inconveniente, y es que c-Raf también presenta 6 residuos que son fosforilados por pErk (S29, S43, S289, S296, S301 y S642) (Dougherty et al., 2005). Así, se ha comprobado que una proteína mutante c-Raf, en la que estos residuos no pueden ser fosforilados, permanece activa mucho más tiempo que lo hace una proteína c-Raf silvestre. Por tanto esta hipótesis

7. Discusión

podría tener sentido si c-Raf se inactiva de una forma más lenta que B-Raf (al igual que, debido a su mecanismo de activación, creemos que se activa más lentamente), si la señal transmitida a través de c-Raf es mucho menos intensa y genera una menor retroalimentación negativa por parte de pErk, o una combinación de ambas. De esta forma, B-Raf transmitiría una señal más corta pero más intensa, mientras que c-Raf transmitiría una señal menos intensa pero más sostenida, algo que en principio evitaría los mecanismos de senescencia.

En cualquier caso la inactivación de B-Raf y posterior activación de c-Raf, fuera cual fuera la razón por la que esto sucediera, implicaría que un mecanismo que trata de evitar el exceso de señales que podríamos denominar pro-tumorales, acabaría favoreciendo el desarrollo del tumor. Esto último quiere decir que una señalización oncogénica a través de B-Raf lleva a la senescencia celular en el pulmón, mientras que la conducción de la vía, a través de c-Raf, promovería la aparición del tumor. Así, en las líneas de melanoma humano, de las que hemos hablado anteriormente, se ha visto que además de la mutación en *N-RAS* es necesario que, al mismo tiempo, se produzca una alteración del metabolismo del AMPc (Dumaz et al., 2006). De esta forma c-RAF, que en condiciones elevadas de AMPc se encuentra inhibido por la fosforilación de PKA, podría ser activado por RAS.

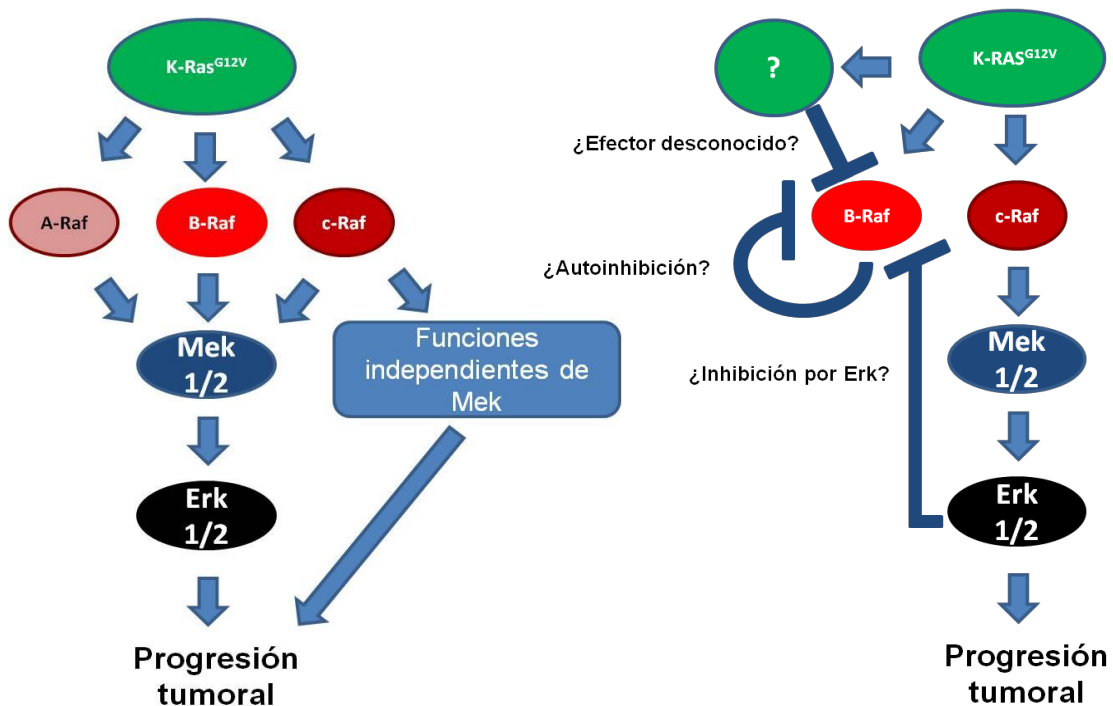


Figura 44. Diferentes hipótesis de la esencialidad de c-Raf en el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón promovidos por la expresión de K-Ras^{G12V}. Panel izquierdo. Aunque la vía Erk-Mapk es esencial para el desarrollo de los tumores, la ausencia de c-Raf, como activador de Mek, podría ser compensada por A-Raf y B-Raf. Sin embargo, otras funciones, independientes de esta activación, no podrían ser compensadas. Panel derecho. c-Raf es, dentro del contexto oncogénico de K-Ras, esencial en la activación de la vía Erk-Mapk, la cual es, a su vez, imprescindible en el desarrollo de tumores promovidos por la mencionada oncoproteína.

Por tanto, es probable que en las células del epitelio pulmonar tuviera que ocurrir una alteración adicional a la mutación en Ras. Otra posibilidad sería que ese mecanismo, por el cual B-Raf queda bloqueado, tuviera sentido en condiciones de homeostasis, con el fin de regular la intensidad de la señal y su duración. En este contexto de homeostasis, c-Raf estaría normalmente inhibido. Sin embargo, en una situación en la que hay una constante señalización de Ras, c-Raf terminaría por activarse y transmitir la señal oncogénica.

Otro factor a tener en cuenta es que en los animales invertebrados solo existe una quinasa Raf, la cual es homóloga a B-Raf. La aparición evolutiva de A-Raf y c-Raf podría tener que ver con una modulación de la señal en ciertos tejidos, de tal manera que, con la activación de Ras, se podría transmitir una señal con duración e intensidad diferente según lo requerido por el tejido en cuestión. Esto ocurre con otras proteínas. Así, la ausencia de Cdk4 ha mostrado no poder ser compensada por ninguna otra Cdk en las células β de los islotes pancreáticos (células que producen la insulina), mientras que en otros tejidos es prescindible (Rane et al., 1999). Por tanto, podría ocurrir que c-Raf fuera una proteína importante en las células del epitelio pulmonar para activar la vía Erk-Mapk. Sin embargo, al eliminar c-Raf en el pulmón no se han observado lesiones en el mismo, por tanto esto último parece ser poco probable.

En conclusión, se puede decir que c-Raf es esencial para que las células que expresan K-Ras^{G12V} den lugar a tumores, sin embargo, este mismo hecho hacía que fuera difícil determinar con precisión el mecanismo responsable del mismo. La eliminación de c-Raf de tumores preexistentes podría facilitar la tarea de buscar el mecanismo, siempre y cuando c-Raf siguiera siendo esencial en el mantenimiento del tumor. Así por ejemplo, en tumores de páncreas promovidos por K-Ras^{G12V}, es necesario un proceso de transdiferenciación de células acinares a células ductales (Guerra et al., 2007). Si c-Raf fuera únicamente esencial en un proceso similar de transdiferenciación en el pulmón, es muy probable que fuera prescindible en el mantenimiento de los tumores.

7.4 Posible especificidad de tejido de la acción oncogénica de c-Raf

Los resultados de proliferación obtenidos en MEFs, parecían indicar que en este tipo celular concreto la influencia de c-Raf y B-Raf sobre la proliferación era exactamente igual, cuando la forma oncogénica de K-Ras era expresada. Como la proliferación celular de las células que expresan K-Ras^{G12V} no es superior a la de aquellas que expresan la forma silvestre, con una suplementación óptima de suero, se decidió llevar a las células a condiciones limitantes de FBS, de tal manera que la señalización celular dependiera fundamentalmente de la forma oncogénica de K-Ras, constitutivamente activa, y no de la

7. Discusión

forma silvestre (que requiere una activación por factores de crecimiento). Sin embargo en estas condiciones la eliminación de c-Raf y de B-Raf causaba el mismo efecto, y solo las células que poseían las tres isoformas de Raf continuaban proliferando. Una posible explicación es que la esencialidad de c-Raf en células que tienen activado K-Ras^{G12V}, dependa del tipo celular.

A lo largo de todo el trabajo se han hablado de las múltiples funciones que desempeña esta vía, por tanto que en la proliferación celular ambas isoformas sean igual de importantes no quiere decir que lo sean para el resto de las funciones. Así se vio que la capacidad de evadir la senescencia replicativa se encontraba alterada en las células en las que se había eliminado c-Raf en presencia de K-Ras^{G12V}, sin embargo las células que carecían de B-Raf superaban este proceso.

A lo largo de la discusión hemos mencionado, para todas las isoformas, que es posible que exista una especificidad de función atendiendo al tejido. Realmente lo que puede estar ocurriendo es que no solo sea algo dependiente del tejido, sino de la función en particular que se está evaluando. Es muy probable que las diferentes isoformas se hayan ido seleccionando como una forma de modular la intensidad de la señal y esta diferente intensidad se traduce en una respuesta u otra. Así por ejemplo, aunque como hemos dicho B-Raf es muy necesario en la señalización a través de Mek en MEFs, sin embargo en eritroblastos es necesario que sea c-Raf el que active Mek para que estos no se diferencien y continúen proliferando (Rubiolo et al., 2006).

Pero quizá este hecho es más claro de ver con las proteínas de Mek, porque ambas tienen el único mismo efector, Erk1/2. En ellas la única forma de explicar que en determinadas circunstancias haya una diferencia de roles entre ellas es que, aunque la señalización en el global sea la misma, determinadas funciones intracelulares sean controladas por una u otra. Así por ejemplo, la proteína scaffold MP1 interacciona en endosomas tardíos, sólo con Mek1 y Erk1, esta señal estaría implicada en adhesión celular. Así puede haber funciones tejido específicas, como hemos dicho Mek1 es esencial en el desarrollo de la placenta.

7.5 Posibles implicaciones terapéuticas de la inhibición de c-Raf

Salvando el hecho de que c-Raf sólo tuviera un papel en el proceso inicial del desarrollo del tumor, podría ser una buena diana para el desarrollo de fármacos frente a los adenocarcinomas que presentan mutaciones en *K-RAS*. Los resultados que hemos obtenido, hasta ahora, en los experimentos en los que se elimina c-Raf una vez establecido el tumor, no son aún lo suficientemente robustos como para sostener que c-Raf juegue un papel en el mantenimiento del tumor. Una de las ventajas que presentaría la inhibición de c-Raf es que, al contrario de lo que ocurría con la eliminación de Mek y de

Erk, la eliminación sistémica de c-Raf no causaba toxicidad en los animales. Esto apoyaría la hipótesis de que el tumor requiere c-Raf, al menos para desarrollarse, pero que no es imprescindible en los tejidos normales, por tanto la eliminación de c-Raf, en presencia de K-Ras^{G12V}, daría lugar a un fenómeno que se ha venido a llamar letalidad sintética. El hecho fue aún más sorprendente cuando se vio que al eliminar B-Raf y c-Raf, en animales adultos tratando de mimetizar lo que ocurriría con un inhibidor B-Raf/c-Raf, los animales no sufrían ningún fenotipo severo. Este resultado era importante teniendo en cuenta que en la actualidad no existen inhibidores específicos frente a c-Raf. Además, la señalización de la vía Erk-Mapk solo se veía reducida en algunos tejidos de alta proliferación, como el colon y el intestino, siendo probablemente A-Raf el que pudiera compensar estas ausencias. Este hecho, es decir que la eliminación de B-Raf y c-Raf provoque una caída parcial de p-Mek/pErk, remarca la nota de cautela que hay que poner al comparar la supresión de Mek/Erk con su inhibición. La eliminación de B-Raf/c-Raf produce una caída parcial de la señalización en todas las células del intestino, mientras que en el otro caso se producía una eliminación total de la señalización en algunas células del intestino llevando a la muerte del animal.

Una circunstancia que habría que tener en cuenta a la hora de considerar c-Raf como posible diana para fármacos contra este tipo concreto de adenocarcinomas, es la diferencia entre inhibir la actividad quinasa y eliminar la proteína de forma completa. Como se ha mencionado en este trabajo, algunas de las funciones que c-Raf desempeña son independientes de su actividad quinasa, si una de estas funciones fuera la responsable de la actividad tumoral, la inhibición de la actividad quinasa no tendría ninguna consecuencia sobre el tumor. Por tanto, sería interesante hacer otro estudio en el cuál se activara la expresión de K-Ras^{G12V} y posteriormente se induciría la expresión de una forma de c-Raf sin actividad quinasa, al mismo tiempo que se eliminara su forma catalíticamente activa.

Otro factor que se tiene que tener en cuenta a la hora de emplear inhibidores contra las proteínas Raf es la formación de heterodímeros B-Raf: c-Raf. Las tres proteínas Raf se pueden encontrar en su forma monomérica, homodimérica, o formando dímeros con otra proteína Raf (Garnett et al., 2005; Rushworth et al., 2006; Weber et al., 2001), aunque sobre todas estas estructuras hay cierta controversia. Primero porque hay recientes estudios, realizados en *Drosophila*, que indican que es necesario que los monómeros homodimericen para ser activos (Rajakulendran et al., 2009). Segundo porque aunque los heterodímeros B-Raf: c-Raf se han descrito como una forma poco frecuente (<1%), se calcula que su actividad quinasa es 300 veces superior a la de B-Raf, la quinasa más activa como fue mencionado con anterioridad (Rushworth et al., 2006). De este dato se podría pensar que pueden tener cierta importancia en la regulación fina de ciertos procesos, al transmitir una señal más fuerte. Es importante no olvidar a la tercera quinasa Raf, A-Raf, para la cual también se ha descrito la formación de heterodímeros con B-Raf y c-Raf (Hatzivassiliou et al., 2010). También se cree que el número de heterodímeros podría estar infravalorada debido a que la interacción entre B-Raf y c-Raf no parece ser muy estable, al menos en

7. Discusión

cultivos celulares. Sin embargo, hay diferentes estudios que han demostrado que el tratamiento con inhibidores de B-Raf/c-Raf, y concretamente aquellos que van dirigidos contra el sitio de unión al ATP, provocaban una estabilización de los heterodímeros, cuando Ras se encontraba activado, aumentando la señalización (Hatzivassiliou et al., 2010; Heidorn et al., 2010; Poulikakos et al., 2010). Esta paradoja, por la cual los inhibidores pan-RAF provocan una mayor activación de MEK, ha sido explicada con el hecho de que la unión del inhibidor al centro catalítico de B-RAF, provoca la estabilización de los heterodímeros y la actividad catalítica de los mismos residiría en c-RAF. Esto se daba cuando los inhibidores tenían una mayor afinidad frente a B-RAF que frente a c-RAF (algo que en general es cierto porque como B-RAF se encuentra más frecuentemente mutado en tumores que c-RAF, los inhibidores se han diseñado para tener más afinidad por el primero), de tal manera que al incrementar la dosis de inhibidor, éste se unía también a c-RAF quedando anulada la actividad catalítica del heterodímero. Esta estabilización de heterodímeros se daba de igual forma con formas mutantes de B-RAF, las cuales inactivaban su actividad quinasa, en líneas celulares con mutaciones en RAS. Además, se ha visto en un modelo animal (Heidorn et al., 2010). La combinación de una mutación en *B-Raf*, la cual inactivaba la actividad quinasa, con el modelo de expresión condicional de K-Ras^{G12D}, provocaba la aparición de melanomas debido a un aumento de la señalización de la vía Erk-Mapk, cuando ambos se expresaban en melanocitos (Tyr-CreERT2). Esto no ocurría cuando solamente se expresaba K-Ras^{G12D}. Como se ha dicho, los inhibidores que existen en la actualidad o inhiben B-Raf/c-Raf, o son más específicos de B-Raf, puesto que han sido diseñados para bloquear a la forma mutada B-Raf^{V600E} (Revisado por Flaherty y McArthur, 2010), sin embargo, teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, los inhibidores para tumores pulmonares en los que hay una forma mutada de K-Ras, deberían ser idealmente lo más específicamente posibles frente a c-Raf. Primero, porque según nuestros resultados es la proteína responsable de transmitir la señal oncogénica de K-RAS y segundo, porque aunque se promoviera la estabilización de heterodímeros, el inhibidor bloquearía el centro activo de c-Raf antes que el de B-Raf. Una forma de evitar la estabilización de heterodímeros y aumentar la especificidad del inhibidor, sería un inhibidor alostérico frente a c-Raf.

8. *Conclusiones*

Las conclusiones obtenidas en este trabajo fueron:

1. La eliminación de una sola isoforma Mek o Erk no es suficiente para impedir el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por K-Ras^{G12V}, puesto que la función de la isoforma ausente es compensada por la que permanece.
2. En ausencia de ambas isoformas Mek o Erk, la expresión de K-Ras^{G12V} no lleva al desarrollo de adenomas y adenocarcinomas de pulmón, demostrando que esta vía es esencial en este proceso. Así mismo esta vía también mostró ser esencial para la homeostasis del animal.
3. La presencia de c-Raf, pero no de B-Raf, es imprescindible para el desarrollo de tumores de pulmón promovidos por K-Ras^{G12V}, pero no lo es para la homeostasis del animal.
4. La ausencia conjunta de c-Raf y B-Raf no tiene consecuencias para la homeostasis del animal.
5. La ausencia de la proteína c-Raf bloquea el desarrollo de los mencionados tumores, mediante un mecanismo sin determinar, distinto de apoptosis y senescencia.
6. La ausencia de c-Raf, o de c-Raf y B-Raf conjuntamente, parecen afectar al mantenimiento de los tumores promovidos por K-Ras^{G12V} (resultados preliminares).

9. *Referencias*

- Balmano, K., and Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16, 368-377.
- Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., and Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63, 851-859.
- Belanger, L.F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A.M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 23, 4778-4787.
- Bessard, A., Fremin, C., Ezan, F., Fautrel, A., Gailhouse, L., and Baffet, G. (2008). RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene*.
- Bissonauth, V., Roy, S., Gravel, M., Guillemette, S., and Charron, J. (2006). Requirement for Map2k1 (Mek1) in extra-embryonic ectoderm during placentogenesis. *Development* 133, 3429-3440.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., *et al.* (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467, 596-599.
- Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S., and Wigler, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48, 789-799.
- Brunet, A., Pages, G., and Pouyssegur, J. (1994). Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett* 346, 299-303.
- Bunney, T.D., and Katan, M. (2006). Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends Cell Biol* 16, 640-648.
- Capon, D.J., Seeburg, P.H., McGrath, J.P., Hayflick, J.S., Edman, U., Levinson, A.D., and Goeddel, D.V. (1983). Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 304, 507-513.

9. Referencias

- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A.T., Thomas, G., Kozma, S.C., *et al.* (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 118, 3065-3074.
- Catalanotti, F., Reyes, G., Jesenberger, V., Galabova-Kovacs, G., de Matos Simoes, R., Carugo, O., and Baccarini, M. (2009). A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat Struct Mol Biol* 16, 294-303.
- Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 184-192.
- Chen, A.P., Ohno, M., Giese, K.P., Kuhn, R., Chen, R.L., and Silva, A.J. (2006). Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. *J Neurosci Res* 83, 28-38.
- Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T., and Fu, H. (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7783-7788.
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 21, 379-384.
- Dasgupta, P., Rastogi, S., Pillai, S., Ordonez-Ercan, D., Morris, M., Haura, E., and Chellappan, S. (2006). Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J Clin Invest* 116, 2208-2217.
- Dasgupta, P., Sun, J., Wang, S., Fusaro, G., Betts, V., Padmanabhan, J., Sebt, S.M., and Chellappan, S.P. (2004). Disruption of the Rb--Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 9527-9541.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

Dougherty, M.K., Muller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.

Downward, J., Riehl, R., Wu, L., and Weinberg, R.A. (1990). Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5998-6002.

Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E.Y., Urosevic, J., Lechuga, C.G., Esteban, L.M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E., and Barbacid, M. (2010). Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *Embo J* 29, 1091-1104.

Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J.A., Bastian, B.C., Springer, C., and Marais, R. (2006). In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 66, 9483-9491.

Ehrenreiter, K., Kern, F., Velamoor, V., Meissl, K., Galabova-Kovacs, G., Sibilio, M., and Baccarini, M. (2009). Raf-1 addiction in Ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 16, 149-160.

Ehrenreiter, K., Piazzolla, D., Velamoor, V., Sobczak, I., Small, J.V., Takeda, J., Leung, T., and Baccarini, M. (2005). Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 168, 955-964.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9, 550-562.

Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., *et al.* (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 14, 1351-1356.

Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.

Fan, H.Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P.F., Hedrick, S.M., and Richards, J.S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324, 938-941.

9. Referencias

Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pages, G., Pouyssegur, J., and Hedrick, S.M. (2005). The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23, 431-443.

Fisher, G.H., Wellen, S.L., Klimstra, D., Lenczowski, J.M., Tichelaar, J.W., Lizak, M.J., Whitsett, J.A., Koretsky, A., and Varmus, H.E. (2001). Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* 15, 3249-3262.

Flaherty, K.T., and McArthur, G. (2010). BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. *Cancer* 116, 4902-4913.

Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., *et al.* (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 809-819.

Friedrich, G., and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5, 1513-1523.

Galabova-Kovacs, G., Kolbus, A., Matzen, D., Meissl, K., Piazzolla, D., Rubiolo, C., Steinitz, K., and Baccarini, M. (2006a). ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 5, 1514-1518.

Galabova-Kovacs, G., Matzen, D., Piazzolla, D., Meissl, K., Plyushch, T., Chen, A.P., Silva, A., and Baccarini, M. (2006b). Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1325-1330.

Garnett, M.J., Rana, S., Paterson, H., Barford, D., and Marais, R. (2005). Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 20, 963-969.

George, D.L., Scott, A.F., Trusko, S., Glick, B., Ford, E., and Dorney, D.J. (1985). Structure and expression of amplified cKi-ras gene sequences in Y1 mouse adrenal tumor cells. *Embo J* 4, 1199-1203.

Georges, R.N., Mukhopadhyay, T., Zhang, Y., Yen, N., and Roth, J.A. (1993). Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct. *Cancer Res* 53, 1743-1746.

Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Allard, W.J., Sigal, I.S., and Scolnick, E.M. (1988). Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5026-5030.

Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., *et al.* (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 9, 369-372.

Gonzalez-Garcia, A., Pritchard, C.A., Paterson, H.F., Mavria, G., Stamp, G., and Marshall, C.J. (2005). RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 7, 219-226.

Graziano, S.L., Gamble, G.P., Newman, N.B., Abbott, L.Z., Rooney, M., Mookherjee, S., Lamb, M.L., Kohman, L.J., and Poiesz, B.J. (1999). Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17, 668-675.

Gu, H., Zou, Y.R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-1164.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111-120.

Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Canamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Perez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11, 291-302.

Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J. (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* 129, 957-968.

Hainsworth, J.D., Cebotaru, C.L., Kanarev, V., Ciuleanu, T.E., Damyanov, D., Stella, P., Ganchev, H., Pover, G., Morris, C., and Tzekova, V. (2010). A phase II, open-label, randomized study to assess the efficacy and safety of AZD6244 (ARRY-142886) versus pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *J Thorac Oncol* 5, 1630-1636.

Hancock, J.F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.

9. Referencias

Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., and Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8, 847-856.

Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., *et al.* (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431-435.

Haura, E.B., Ricart, A.D., Larson, T.G., Stella, P.J., Bazhenova, L., Miller, V.A., Cohen, R.B., Eisenberg, P.D., Selaru, P., Wilner, K.D., *et al.* (2010). A phase II study of PD-0325901, an oral MEK inhibitor, in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2450-2457.

Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., *et al.* (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140, 209-221.

Horio, Y., Chen, A., Rice, P., Roth, J.A., Malkinson, A.M., and Schrump, D.S. (1996). Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog* 7, 217-223.

Jackson, E.L., Olive, K.P., Tuveson, D.A., Bronson, R., Crowley, D., Brown, M., and Jacks, T. (2005). The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer Res* 65, 10280-10288.

Jackson, E.L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R.T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D.A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.

James, G.L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1995). Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro. *J Biol Chem* 270, 6221-6226.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.

Jesenberger, V., Procyk, K.J., Ruth, J., Schreiber, M., Theussl, H.C., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J Exp Med* 193, 353-364.

- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R.T., Crowley, D., Tuveson, D.A., and Jacks, T. (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410, 1111-1116.
- Jonkers, J., and Berns, A. (2002). Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 251-265.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 517-531.
- Karreth, F.A., DeNicola, G.M., Winter, S.P., and Tuveson, D.A. (2009). C-Raf inhibits MAPK activation and transformation by B-Raf(V600E). *Mol Cell* 36, 477-486.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823-835.
- Kinkade, R., Dasgupta, P., Carie, A., Pernazza, D., Carless, M., Pillai, S., Lawrence, N., Sebti, S.M., and Chellappan, S. (2008). A small molecule disruptor of Rb/Raf-1 interaction inhibits cell proliferation, angiogenesis, and growth of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res* 68, 3810-3818.
- Kohl, N.E., Omer, C.A., Conner, M.W., Anthony, N.J., Davide, J.P., deSolms, S.J., Giuliani, E.A., Gomez, R.P., Graham, S.L., Hamilton, K., *et al.* (1995). Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med* 1, 792-797.
- Kohl, N.E., Wilson, F.R., Mosser, S.D., Giuliani, E., deSolms, S.J., Conner, M.W., Anthony, N.J., Holtz, W.J., Gomez, R.P., Lee, T.J., *et al.* (1994). Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9141-9145.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Lambert, J.M., Lambert, Q.T., Reuther, G.W., Malliri, A., Siderovski, D.P., Sondek, J., Collard, J.G., and Der, C.J. (2002). Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* 4, 621-625.

9. Referencias

- Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2008). Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* 28, 511-527.
- Malkinson, A.M. (1989). The genetic basis of susceptibility to lung tumors in mice. *Toxicology* 54, 241-271.
- Malkinson, A.M. (2001). Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing, and treating human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 32, 265-279.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
- Malliri, A., van der Kammen, R.A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., and Collard, J.G. (2002). Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417, 867-871.
- Martin, G.A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P.C., Crosier, W.J., Haubruck, H., Conroy, L., Clark, R., O'Connell, P., Cawthon, R.M., *et al.* (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63, 843-849.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Chappell, W.H., Russo, S., Ove, R., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., *et al.* (2010). Emerging MEK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs* 15, 203-223.
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Smith, D.H., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Goeddel, D.V., and Levinson, A.D. (1983). Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304, 501-506.
- Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.
- Mercer, K., Giblett, S., Green, S., Lloyd, D., DaRocha Dias, S., Plumb, M., Marais, R., and Pritchard, C. (2005). Expression of endogenous oncogenic V600EB-raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts. *Cancer Res* 65, 11493-11500.
- Mercer, K.E., and Pritchard, C.A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 1653, 25-40.
- Meuwissen, R., and Berns, A. (2005). Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev* 19, 643-664.

Meuwissen, R., Linn, S.C., Linnoila, R.I., Zevenhoven, J., Mooi, W.J., and Berns, A. (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* 4, 181-189.

Meuwissen, R., Linn, S.C., van der Valk, M., Mooi, W.J., and Berns, A. (2001). Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene. *Oncogene* 20, 6551-6558.

Meylan, E., Dooley, A.L., Feldser, D.M., Shen, L., Turk, E., Ouyang, C., and Jacks, T. (2009). Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462, 104-107.

Mijimolle, N., Velasco, J., Dubus, P., Guerra, C., Weinbaum, C.A., Casey, P.J., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2005). Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development. *Cancer Cell* 7, 313-324.

Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* 20, 1952-1962.

Milstein, M., Mooser, C.K., Hu, H., Fejzo, M., Slamon, D., Goodglick, L., Dry, S., and Colicelli, J. (2007). RIN1 is a breast tumor suppressor gene. *Cancer Res* 67, 11510-11516.

Molloy, C.J., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., and Aaronson, S.A. (1989). PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature* 342, 711-714.

Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31, 268-275.

Niault, T.S., and Baccarini, M. (2010). Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 31, 1165-1174.

O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., and Kolch, W. (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306, 2267-2270.

Ogino, S., Nosho, K., Kirkner, G.J., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Chan, A.T., Engelman, J.A., Kraft, P., Cantley, L.C., *et al.* (2009). PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 27, 1477-1484.

9. Referencias

- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.
- Pells, S., Divjak, M., Romanowski, P., Impey, H., Hawkins, N.J., Clarke, A.R., Hooper, M.L., and Williamson, D.J. (1997). Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 15, 1781-1786.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33, 19-20.
- Ponting, C.P., and Benjamin, D.R. (1996). A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci* 21, 422-425.
- Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427-430.
- Pritchard, C.A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 6, 614-617.
- Pritchard, C.A., Hayes, L., Wojnowski, L., Zimmer, A., Marais, R.M., and Norman, J.C. (2004). B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 24, 5937-5952.
- Puyol, M., Martin, A., Dubus, P., Mulero, F., Pizcueta, P., Khan, G., Guerra, C., Santamaria, D., and Barbacid, M. (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 18, 63-73.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418, 934.
- Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrancois, M., Sicheri, F., and Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 461, 542-545.

- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22, 44-52.
- Re, F.C., Manenti, G., Borrello, M.G., Colombo, M.P., Fisher, J.H., Pierotti, M.A., Della Porta, G., and Dragani, T.A. (1992). Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol Carcinog* 5, 155-160.
- Rinehart, J., Adjei, A.A., Lorusso, P.M., Waterhouse, D., Hecht, J.R., Natale, R.B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E.P., *et al.* (2004). Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22, 4456-4462.
- Ritt, D.A., Monson, D.M., Specht, S.I., and Morrison, D.K. (2009). Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Mol Cell Biol* 30, 806-819.
- Robinson, L.C., Gibbs, J.B., Marshall, M.S., Sigal, I.S., and Tatchell, K. (1987). CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 235, 1218-1221.
- Rowell, C.A., Kowalczyk, J.J., Lewis, M.D., and Garcia, A.M. (1997). Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-Ras in vivo. *J Biol Chem* 272, 14093-14097.
- Roy, M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2005). IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* 25, 7940-7952.
- Rubiolo, C., Piazzolla, D., Meissl, K., Beug, H., Huber, J.C., Kolbus, A., and Baccarini, M. (2006). A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation. *Blood* 108, 152-159.
- Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 26, 2262-2272.
- Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.L., and Meloche, S. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 4, 964-968.

9. Referencias

- Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A., and Weber, M.J. (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281, 1668-1671.
- Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Charron, J., and Khavari, P.A. (2009a). Mek1/2 gene dosage determines tissue response to oncogenic Ras signaling in the skin. *Oncogene* 28, 1485-1495.
- Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Harada, K., Bissonauth, V., Charron, J., and Khavari, P.A. (2007). Mek1/2 MAPK kinases are essential for Mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Dev Cell* 12, 615-629.
- Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Harada, K., Charron, J., and Khavari, P.A. (2009b). Selective role for Mek1 but not Mek2 in the induction of epidermal neoplasia. *Cancer Res* 69, 3772-3778.
- Scholl, F.A., Dumesic, P.A., and Khavari, P.A. (2004). Mek1 alters epidermal growth and differentiation. *Cancer Res* 64, 6035-6040.
- Sebti, S.M., and Der, C.J. (2003). Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 3, 945-951.
- Shaul, Y.D., and Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1213-1226.
- Shimizu, K., Birnbaum, D., Ruley, M.A., Fasano, O., Suard, Y., Edlund, L., Taparowsky, E., Goldfarb, M., and Wigler, M. (1983). Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 304, 497-500.
- Shimkin, M.B., and Stoner, G.D. (1975). Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv Cancer Res* 21, 1-58.
- Shin, S., Dimitri, C.A., Yoon, S.O., Dowdle, W., and Blenis, J. (2010). ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell* 38, 114-127.
- Shou, C., Farnsworth, C.L., Neel, B.G., and Feig, L.A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 358, 351-354.

Simi, L., Pratesi, N., Vignoli, M., Sestini, R., Cianchi, F., Valanzano, R., Nobili, S., Mini, E., Pazzagli, M., and Orlando, C. (2008). High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 130, 247-253.

Simpson, A.J., Wallace, W.A., Marsden, M.E., Govan, J.R., Porteous, D.J., Haslett, C., and Sallenave, J.M. (2001). Adenoviral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection. *J Immunol* 167, 1778-1786.

Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J., and Shih le, M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95, 484-486.

Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C.P., Finch, A.J., Murphy, D.J., Sodir, N.M., Karnezis, A.N., Swigart, L.B., Nasi, S., and Evan, G.I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* 455, 679-683.

Takezawa, K., Okamoto, I., Yonesaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., and Nakagawa, K. (2009). Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res* 69, 6515-6521.

Tall, G.G., Barbieri, M.A., Stahl, P.D., and Horazdovsky, B.F. (2001). Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell* 1, 73-82.

Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., and Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 97, 697-702.

Trahey, M., and McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542-545.

Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G.A., Ladner, M., Long, C.M., Crosier, W.J., Watt, K., Kohts, K., *et al.* (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* 242, 1697-1700.

Travis, W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 23, 65-81, viii.

9. Referencias

Travis, W.D., Branbilla, E., Muller-Hermelin, H.K., and Harris, C.C.E. (2004). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press.

Travis, W.D., Travis, L.B., and Devesa, S.S. (1995). Lung cancer. *Cancer* 75, 191-202.

Tuveson, D.A., Shaw, A.T., Willis, N.A., Silver, D.P., Jackson, E.L., Chang, S., Mercer, K.L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., *et al.* (2004). Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5, 375-387.

van der Weyden, L., and Adams, D.J. (2007). The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1776, 58-85.

van Etten, B., ten Hagen, T.L., de Vries, M.R., Ambagtsheer, G., Huet, T., and Eggermont, A.M. (2002). Prerequisites for effective adenovirus mediated gene therapy of colorectal liver metastases in the rat using an intracellular neutralizing antibody fragment to p21-Ras. *Br J Cancer* 86, 436-442.

Vogel, U.S., Dixon, R.A., Schaber, M.D., Diehl, R.E., Marshall, M.S., Scolnick, E.M., Sigal, I.S., and Gibbs, J.B. (1988). Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 335, 90-93.

Voisin, L., Saba-El-Leil, M.K., Julien, C., Fremin, C., and Meloche, S. (2010). Genetic demonstration of a redundant role of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 mitogen-activated protein kinases in promoting fibroblast proliferation. *Mol Cell Biol* 30, 2918-2932.

Vos, M.D., Martinez, A., Ellis, C.A., Vallecorsa, T., and Clark, G.J. (2003). The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *J Biol Chem* 278, 21938-21943.

Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A.L., *et al.* (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249, 181-186.

Wang, S., Ghosh, R.N., and Chellappan, S.P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* 18, 7487-7498.

Wang, Y., and You, M. (2001). Alternative splicing of the K-ras gene in mouse tissues and cell lines. *Exp Lung Res* 27, 255-267.

Weber, C.K., Slupsky, J.R., Kalmes, H.A., and Rapp, U.R. (2001). Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res* 61, 3595-3598.

Wei, W., Mosteller, R.D., Sanyal, P., Gonzales, E., McKinney, D., Dasgupta, C., Li, P., Liu, B.X., and Broek, D. (1992). Identification of a mammalian gene structurally and functionally related to the CDC25 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7100-7104.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875-885.

West, M., Kung, H.F., and Kamata, T. (1990). A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins. *FEBS Lett* 259, 245-248.

Wojnowski, L., Stancato, L.F., Zimmer, A.M., Hahn, H., Beck, T.W., Lerner, A.C., Rapp, U.R., and Zimmer, A. (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* 76, 141-149.

Wojnowski, L., Zimmer, A.M., Beck, T.W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U.R., and Zimmer, A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 16, 293-297.

Wolfman, A., and Macara, I.G. (1990). A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science* 248, 67-69.

Worden, F.P., and Kalemkerian, G.P. (2000). Therapeutic advances in small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 565-579.

Xu, B., Wilsbacher, J.L., Collisson, T., and Cobb, M.H. (1999). The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *J Biol Chem* 274, 34029-34035.

Xu, G.F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R., *et al.* (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62, 599-608.

9. Referencias

Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsu, S., Asahi, M., Taniike, M., *et al.* (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 114, 937-943.

Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., and Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* 16, 1171-1182.

Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S., Kuida, K., and Boucher, D.M. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12759-12764.

Yin, G., Haendeler, J., Yan, C., and Berk, B.C. (2004). GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 24, 875-885.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.

Young, A., Lyons, J., Miller, A.L., Phan, V.T., Alarcon, I.R., and McCormick, F. (2009). Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res* 102, 1-17.

10. Anexo

c-Raf, but Not B-Raf, Is Essential for Development of *K-Ras* Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Carcinoma

Rafael B. Blasco,^{1,6} Sarah Francoz,^{1,6} David Santamaría,¹ Marta Cañamero,² Pierre Dubus,³ Jean Charron,⁴ Manuela Baccarini,⁵ and Mariano Barbacid^{1,*}

¹Molecular Oncology

²Biotechnology Programmes

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), E-28029 Madrid, Spain

³Université de Bordeaux, EA2406, F-33076 Bordeaux, France

⁴Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, CRCHUQ, Hôtel-Dieu de Québec, Québec, QC G1R 2J6, Canada

⁵Max F. Perutz Laboratories, Center for Molecular Biology, University of Vienna, Vienna 1030, Austria

⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence: mbarbacid@cnio.es

DOI 10.1016/j.ccr.2011.04.002

SUMMARY

We have investigated the role of individual members of the Raf/Mek/Erk cascade in the onset of *K-Ras* oncogene-driven non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Ablation of Erk1 or Erk2 in *K-Ras* oncogene-expressing lung cells had no significant effect due to compensatory activities. Yet, elimination of both Erk kinases completely blocked tumor development. Similar results were obtained with Mek kinases. Ablation of *B-Raf* had no significant effect on tumor development. However, c-Raf expression was absolutely essential for the onset of NSCLC. Interestingly, concomitant elimination of *c-Raf* and *B-Raf* in adult mice had no deleterious consequences for normal homeostasis. These results indicate that c-Raf plays a unique role in mediating *K-Ras* signaling and makes it a suitable target for therapeutic intervention.

INTRODUCTION

Ras proteins are small GTPases that serve as mitogenic switches to convey information generated at the cell surface to the nuclear transcriptional machinery through multiple effector cascades. These proteins have been extensively characterized at the structural, biochemical, and cellular level due to their central role in eukaryotic biology, as well as their implication in cancer development (Malumbres and Barbacid, 2003; Karnoub and Weinberg, 2008). To date, multiple Ras downstream effectors have been identified. It is generally accepted that the Raf/Mek/Erk cascade of kinases is the primary mediator of mitogenic activity (Marshall, 1994). Another well-known pathway, the PI3Kinase/Pdk/Akt pathway, is thought to mediate survival signals (Cully et al., 2006; Engelman et al., 2006). Other

Ras effectors include the GDP/GTP exchange factors Tiam1 and RalGDS, which are responsible for activating other families of small GTPases involved in the control of cell polarity and motility as well as membrane trafficking (Malliri and Collard, 2003; Camonis and White, 2005). Other downstream effectors such as PLC ϵ , AF6, Rin1, and RASSF have been less extensively characterized.

Despite this wealth of information, little is known about the precise pathways that mediate RAS oncogenic signaling in cancer. *K-RAS*, the *RAS* oncogene most frequently mutated in human cancer, has been implicated in a variety of tumor types including non-small cell lung carcinoma (NSCLC), one of the tumors with the worst prognosis and for which, to our knowledge, there are no effective treatments (Malumbres and Barbacid, 2003; Karnoub and Weinberg, 2008). Genetic studies in

Significance

K-RAS oncogenes have been implicated in one-fourth of non-small cell lung carcinomas (NSCLCs), one of the human tumors with the worst prognosis. Although *K-RAS* signals through a cascade of druggable kinases including the RAF, MEK1/2, and ERK1/2 kinases, to our knowledge, it is not known how these individual kinases contribute to tumor development. Here, we demonstrate that ablation of Mek1/2 or Erk1/2 kinases completely prevents tumor development, although their systemic elimination is incompatible with adult life. In contrast, ablation of *c-Raf* completely prevents *K-Ras*-driven NSCLC without inducing deleterious effects when systemically eliminated in adult tissues, either alone or in combination with *B-Raf*. These observations point to c-RAF as a suitable target for therapeutic intervention in *K-RAS*-driven NSCLC.

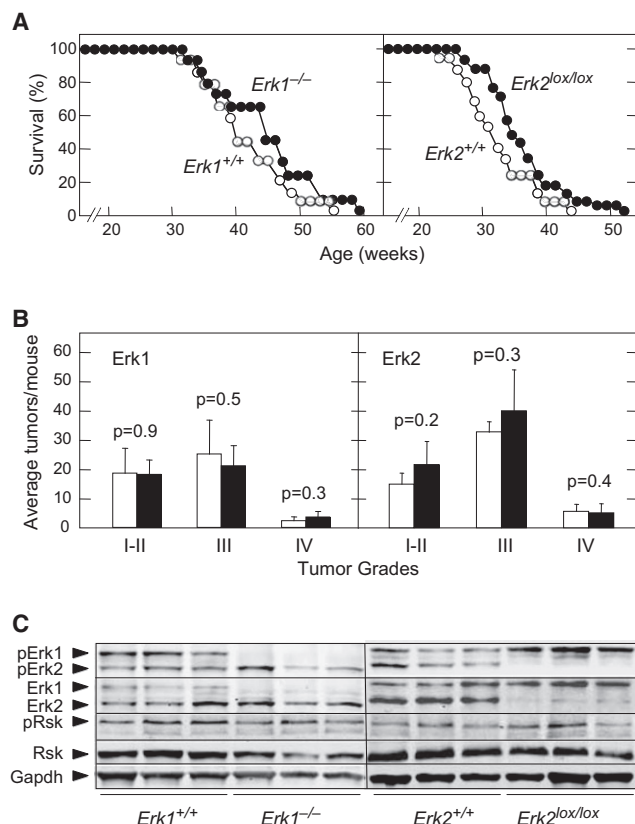


Figure 1. *K-Ras*^{G12V} Induces NSCLCs in the Absence of Erk1 or Erk2

(A) The left panel shows survival of *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{+/+} (n = 17) (open circles) and *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{-/-} (n = 14) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age. The right panel illustrates survival of *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{+/+} (n = 19) (open circles) and *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{lox/lox} (n = 32) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age.

(B) The left panel shows the number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{+/+} (n = 5) (open bars) and *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{-/-} (n = 5) (solid bars) mice sacrificed 6 months after Ad-Cre treatment. The right panel illustrates the number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{+/+} (n = 5) (open bars) and *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{lox/lox} (n = 5) (solid bars) mice sacrificed 6 months after Ad-Cre treatment. Error bars indicate mean ± SD. p values were calculated according to Student's t test.

(C) Western blot analysis of pErk1/2, Erk1/2, pRsk, and Rsk expression in lysates prepared from individual tumors of the indicated genotype collected 8 months after Ad-Cre treatment. Gapdh is shown as a loading control. Migration of the above proteins is indicated by arrowheads.

See also Figure S1.

mouse models of NSCLC (Johnson et al., 2001) have indicated that *K-Ras* may signal through the PI3Kinase/Akt pathway. Mice carrying a germline mutation in the alpha subunit of PI3Kinase that prevents interaction with Ras proteins developed significantly fewer lung tumors than control mice (Gupta et al., 2007). Ablation of the two loci encoding the p85 regulatory subunits of PI3Kinase also resulted in significant reduction of the number of tumors appearing in the same tumor model (Engelman et al., 2008). More recently, new therapeutic targets, including the NF-κB pathway and the cell cycle kinase Cdk4, have been identified by synthetic lethal approaches (Meylan et al., 2009; Puyol et al., 2010). Other potential targets identified

by in vitro screens include the noncanonical IκB kinase, Tbk1, and the mitotic PLK1 kinase (Barbie et al., 2009; Luo et al., 2009). Interestingly, there is little information on the distinct contributions of the Raf/Mek/Erk kinases to *K-Ras*-induced NSCLC.

We undertook the present study to systematically examine by genetic means the contribution of the Raf/Mek/Erk cascade of kinases in a mouse model of *K-Ras*-driven NSCLC (Guerra et al., 2003). To this end, we have used strains of mice carrying mutations within *loci* encoding Raf, Mek, and Erk kinases to investigate whether they are essential for tumor development. The results described below provide information that might be used in the future to design targeted therapies to block *K-RAS*-induced NSCLC in human patients.

RESULTS

Elimination of Individual Erk Kinases Does Not Prevent *K-Ras*^{G12V}-Induced NSCLCs

We investigated whether the Erk kinases, Erk1 and Erk2, were necessary for the induction of NSCLC mediated by a resident *K-Ras*^{G12V} oncogene. *K-Ras*^{G12V} mice (designated from now on as *K-Ras*^{G12V}) (Guerra et al., 2003) were crossed to strains carrying mutated alleles of *Erk1* (*Erk1*^{-/-}) and *Erk2* (*Erk2*^{lox/lox}) (Pagès et al., 1999; Fischer et al., 2005). Eight-week-old *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{-/-} and *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{lox/lox} mice, along with control animals, were exposed by intratracheal instillation to replication-defective adenoviruses encoding the Cre recombinase (Ad-Cre). This strategy allowed expression of the resident *K-Ras*^{G12V} oncoprotein in the infected lung cells upon Cre-mediated recombination of the floxed stop cassette inserted within the *K-Ras* locus (Guerra et al., 2003). In addition the Cre recombinase also ablated the *Erk2*^{lox} alleles in those cells expressing the *K-Ras*^{G12V} oncogene.

Absence of either Erk1 or Erk2 resulted in limited increase of the lifespan of these animals (Figure 1A). Whereas *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{+/+} mice (n = 17) displayed 50% survival at 40 weeks, *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{-/-} animals (n = 14) reached this survival rate at 46.3 weeks, a 20% increase taking into account that tumor development was initiated when mice were 8 weeks old. We obtained similar results when we ablated the locus encoding the Erk2 kinase. Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{lox/lox} mice (n = 32) survived slightly longer than control *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{+/+} (n = 19) animals (50% survival at 34.9 versus 31.2 weeks, a 16% increase in survival) (Figure 1A). The difference in the time at which control mice reached 50% survival is due to the intrinsic variability of the different Ad-Cre preparations. Yet, because the same viral preparation was used for all mice in each experiment, the limited increase in survival observed in mice carrying the targeted *Erk* alleles must be attributable to the absence of the corresponding Erk kinase.

K-Ras^{G12V};*Erk1*^{-/-} and *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{lox/lox} mice sacrificed 6 months after Ad-Cre infection displayed tumor burden similar to those of control animals (Figure 1B). As expected, Erk1 was absent from *K-Ras*^{G12V};*Erk1*^{-/-} NSCLCs. Likewise, Erk2 could not be detected in lung tumors derived from *K-Ras*^{G12V};*Erk2*^{lox/lox} mice (Figure 1C) due to efficient excision of the *Erk2*^{lox} alleles (see Figure S1 available online). Absence of Erk1 or Erk2 did not result in increased expression of the

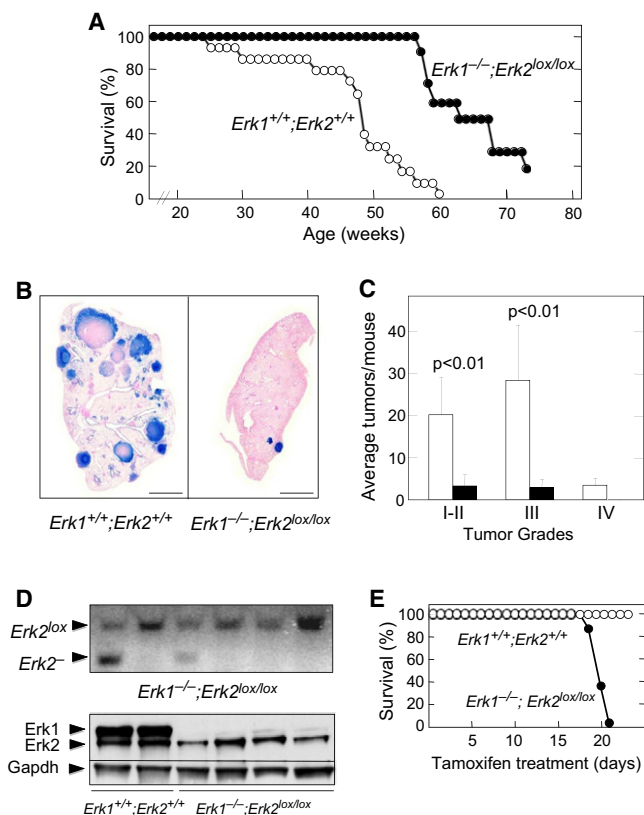


Figure 2. Complete Ablation of Erk1/2 Kinases Prevents Induction of NSCLCs by a Resident *K-Ras*^{G12V} Oncogene

(A) Survival of *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{+/+}; *Erk2*^{+/+} (n = 14) (open circles) and *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} (n = 11) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age.

(B) Whole-mount X-Gal staining of lung sections collected from mice with the indicated genotypes 6 months after Ad-Cre treatment. β-Geo positive cells identified by X-Gal staining (blue color) correspond to cells expressing *K-Ras*^{G12V}. Scale bars, 5 mm.

(C) Number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{+/+}; *Erk2*^{+/+} (n = 7) (open bars) and *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} (n = 10) (solid bars) mice sacrificed 6 months after Ad-Cre treatment. Error bars indicate mean ± SD. p values were calculated according to Student's t test.

(D) The top panel shows Southern blot analysis of genomic DNA isolated from individual tumors of *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} mice 8 months after Ad-Cre treatment. DNAs were digested with KpnI and probed with a 450 bp DNA fragment derived from the third intron just outside the floxed sequences. Migration of the unrecombined *Erk2*^{lox} allele (4.3 kbp) and the ablated *Erk2*⁻ allele (2.4 kbp) is indicated by arrowheads. The bottom panel shows Western blot analysis of Erk1 and Erk2 expression in lysates obtained from individual tumors collected 8 months after Ad-Cre treatment of *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{+/+}; *Erk2*^{+/+} and *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} mice. The presence of Erk2 in tumors of Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} mice, due to incomplete cleavage of the *Erk2*^{lox} allele, indicates that Erk2 is essential for tumor development. Gapdh was used as loading control. Migration of the above proteins is indicated by arrowheads.

(E) Survival of *Erk1*^{+/+}; *Erk2*^{+/+}; *RERT*^{ert/ert} (open circles) and *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} (solid circles) mice fed ad libitum a tamoxifen-containing diet to activate the knocked in CreERT2 recombinase encoded by the *RERT*^{ert} alleles. See also Figure S2.

remaining kinase (Figure 1C). Likewise, the levels of pErk2 were the same in the presence or absence of Erk1, although the levels of pErk1 were slightly elevated in the absence of Erk2 (Figure 1C).

Finally, the phosphorylation levels of Rsk, a well-known Erk downstream substrate, did not change upon elimination of either Erk1 or Erk2 (Figure 1C). These observations suggest that a single Erk kinase, either Erk1 or Erk2, is sufficient to process *K-Ras*^{G12V} oncogenic signaling to initiate NSCLC development.

Elimination of Erk1/2 Kinases Impairs Tumor Development and Induces Lethality in Adult Mice

To evaluate the effect of eliminating both Erk kinases in *K-Ras*^{G12V}-driven tumors, we generated *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} mice and exposed their lungs to Ad-Cre infection. Control *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{+/+}; *Erk2*^{+/+} animals (n = 14) displayed a 50% survival at 48 weeks. Instead, the 50% survival point for *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} mice (n = 11) was reached at 63 weeks (Figure 2A), thus representing a 40% increase in survival. When we examined *K-Ras*^{G12V}; *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox} mice 6 months after turning on *K-Ras*^{G12V} expression, we observed very few tumors compared to control animals (Figures 2B and 2C). More importantly, all tumors tested (n = 6) displayed a prominent band corresponding to the nonrecombined *Erk2*^{lox} allele and expressed normal levels of Erk2, indicating that these tumors were “escapers” (Figure 2D). These observations indicate that Erk2 is required for tumor development in the absence of Erk1.

Next, we examined whether Erk1/2 kinases might be required for normal homeostasis. To this end we generated *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} mice. *RERT*^{ert} mice ubiquitously express an inducible CreERT2 recombinase (Guerra et al., 2003). Thirty-day-old *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} mice were fed ad libitum with a tamoxifen-containing diet to systemically excise the *Erk2*^{lox} alleles. The health of these mice (n = 8) deteriorated rapidly, and all of them died within 3 weeks due to multiple organ failure (Figure 2E). DNA analysis of tissues obtained from moribund animals revealed recombination rates of the *Erk2*^{lox} alleles ranging from 40% to 60% (Figure S2). These observations indicate that loss of Erk proteins is incompatible with life in adult mice. Interestingly, preliminary results indicate that a single *Erk* allele is sufficient to maintain adult homeostasis because *Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} (n = 2) and *Erk1*^{+/+}; *Erk2*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} (n = 3) mice exposed to a tamoxifen diet for 3 months did not show significant abnormalities (data not shown).

Individual Mek1/2 Kinases Are Dispensable for *K-Ras*^{G12V}-Driven NSCLCs

We also evaluated the effect of eliminating the Mek1/2 kinases on tumor development. To this end we used *Mek1*^{lox/lox} (Catalanotti et al., 2009) and *Mek2*^{-/-} (Belanger et al., 2003) strains since Mek1, but not Mek2, is required for survival during embryonic development (Giroux et al., 1999; Belanger et al., 2003; Bissonauth et al., 2006). Survival of Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{lox/lox} mice (n = 14) was slightly increased (50% survival at 44 versus 37.5 weeks in control mice [n = 20], a 22% increase) (Figure 3A). Similar results were observed with *K-Ras*^{G12V}; *Mek2*^{-/-} mice (n = 19) (50% survival at 52 versus 45 weeks in control animals [n = 20], a 19% increase) (Figure 3A). When these mice were sacrificed 6 months after exposure to Ad-Cre, they displayed a similar tumor burden as control animals carrying wild-type *Mek* alleles (Figure 3B). Southern blot analysis of individual tumors isolated from *K-Ras*^{G12V};

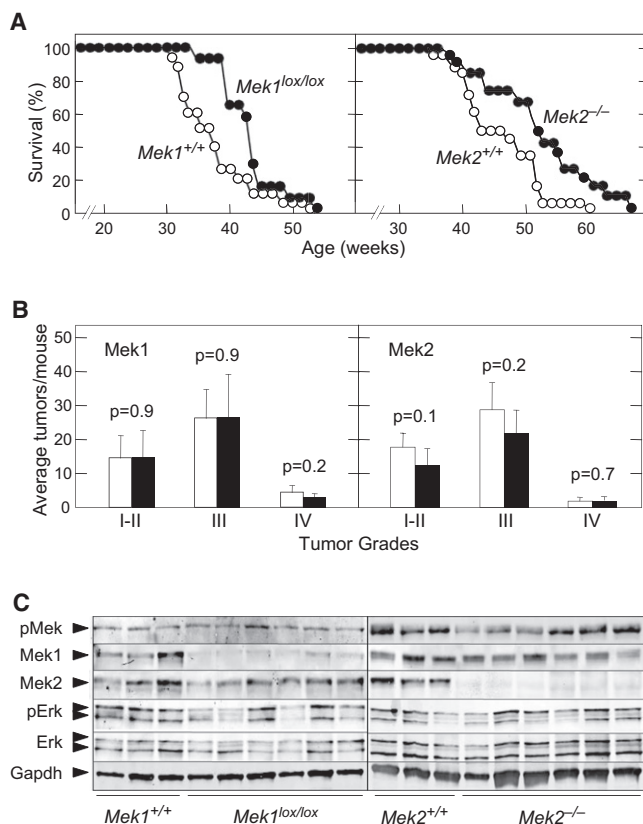


Figure 3. *K-Ras*^{G12V} Induces NSCLCs in the Absence of Mek1 or Mek2

(A) The left panel shows survival of *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{+/+} (n = 20) (open circles) and *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{lox/lox} (n = 14) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age. The right panel illustrates survival of *K-Ras*^{G12V};*Mek2*^{+/+} (n = 20) (open circles) and *K-Ras*^{G12V};*Mek2*^{-/-} (n = 19) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age.

(B) The left panel shows the number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{+/+} (n = 7) (open bars) and *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{lox/lox} (n = 6) (solid bars) mice sacrificed 6 months after Ad-Cre treatment. The right panel illustrates the number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V};*Mek2*^{+/+} (n = 5) (open bars) and *K-Ras*^{G12V};*Mek2*^{-/-} (n = 5) (solid bars) mice sacrificed 6 months after Ad-Cre treatment. Error bars indicate mean \pm SD. p values were calculated according to Student's t test.

(C) Western blot analysis of pMek, Mek1, Mek2, pErk1/2, and Erk1/2 expression in lysates derived from individual tumors of the indicated genotype collected 8 months after Ad-Cre treatment. Gapdh was used as loading control. Migration of the above proteins is indicated by arrowheads. See also Figure S3.

Mek1^{lox/lox} mice revealed that *Mek1*^{lox} alleles had undergone efficient recombination (Figure S3). Indeed, the levels of expression of Mek1 in these tumors were almost undetectable (Figure 3C). As expected, Mek2 could not be detected in tumors isolated from *K-Ras*^{G12V};*Mek2*^{-/-} animals (Figure 3C).

As previously observed with Erk kinases, loss of Mek1 did not result in increased Mek2 expression (Figure 3C). Likewise, the levels of Mek1 were similar in tumors derived from *Mek2*^{-/-} and *Mek2*^{+/+} control mice. No changes were observed in the levels of pMek proteins in those tumors generated in the absence of Mek1 or Mek2 (Figure 3C). Finally, loss of one of

the two Mek kinases had no significant effect on overall Mek activity, as determined by the normal phosphorylation levels displayed by their downstream targets, Erk1/2 (Figure 3C).

Mek1/2 Kinases Are Essential for Tumor Development and Normal Homeostasis

To determine whether both Mek kinases were required for NSCLC, we exposed *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{lox/lox};*Mek2*^{-/-} mice to Ad-Cre. These mice displayed significantly increased survival when compared with control *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{+/+};*Mek2*^{+/+} animals. Whereas the control cohort (n = 10) had a 50% survival rate of 33 weeks, *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{lox/lox};*Mek2*^{-/-} mice (n = 14) had a 50% survival rate at 57 weeks (Figure 4A), thus displaying an almost 100% increase in survival. As illustrated in the case of the Erk kinases, tumors present in *K-Ras*^{G12V};*Mek1*^{lox/lox};*Mek2*^{-/-} mice examined 6 months after Ad-Cre treatment (n = 6) carried unrecombined *Mek1*^{lox} alleles and expressed normal levels of Mek1 (Figures 4B and 4C). These observations indicate that Mek1 expression was essential for tumor development in the absence of Mek2 (Figure 4D).

To examine whether Mek kinase activity was essential for adult homeostasis, *Mek1*^{lox/lox};*Mek2*^{-/-};*RERT*^{ert/ert} mice were exposed to a tamoxifen diet at 30 days of age. These mice (n = 6) also displayed a rapid deterioration of their health, leading to death just 2 weeks after starting the tamoxifen diet (Figure 4E). Southern blot analysis of DNA isolated from tissues of sick/moribund animals revealed recombination rates of *Mek1*^{lox} alleles ranging from 70% to 80% in most tissues (Figure S4A). These observations indicate that the Mek kinases are also essential for adult homeostasis. Whether a single *Mek* allele might be sufficient to sustain adult life remains to be determined.

Necropsy analysis of moribund mice revealed multiple defects, including severe alterations in the structure of intestinal and colonic tissue incompatible with life (Figure S4B). Even limited ablation of *Mek* alleles resulted in significant alterations of the normal architecture, including distorted crypts, blunted and shorter villi, increased lamina propria, and goblet cell hyperplasia. Likewise, the colonic tissue of *Mek1*^{lox/lox};*Mek2*^{-/-};*RERT*^{ert/ert} mice displayed loss as well as severe shortening of the crypts (Figure S4B).

B-Raf Is Dispensable for *K-Ras*^{G12V}-Induced NSCLCs

Raf kinases—A-Raf, B-Raf, and c-Raf—do not have full compensatory activities during embryonic and early postnatal development (Galabova-Kovacs et al., 2006). To examine whether they also played unique roles during *K-Ras*^{G12V}-driven NSCLC, we crossed *K-Ras*^{G12V} mice with *B-Raf*^{lox/lox} (Chen et al., 2006) and *c-Raf*^{lox/lox} (Jesberger et al., 2001) animals and submitted them to infection with Ad-Cre particles. As illustrated in Figure 5A, conditional ablation of *B-Raf*^{lox} alleles in *K-Ras*^{G12V}-induced NSCLC did not increase survival (50% survival of *K-Ras*^{G12V};*B-Raf*^{lox/lox} mice [n = 25] at 41.5 versus 40 weeks in *K-Ras*^{G12V};*B-Raf*^{+/+} control animals [n = 28], a 5% increase). The number and grade of tumors in mice lacking B-Raf 6 months after Ad-Cre treatment were similar to those present in control mice (Figures 5B and 5C). Efficient recombination of the *B-Raf*^{lox} alleles in tumor tissue was determined by Southern (Figure S5) and western (Figure 5D) blot analysis. Immunohistochemistry staining with an anti-B-Raf antibody

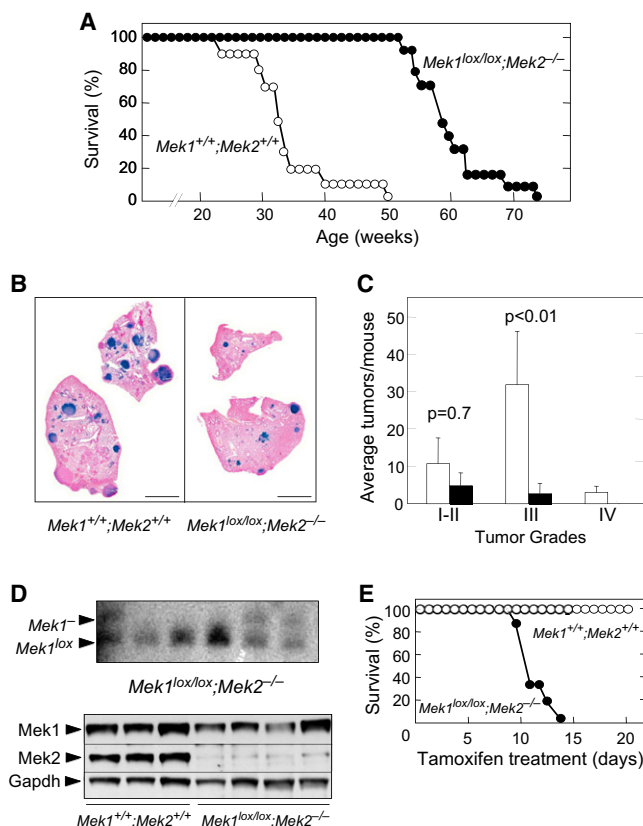


Figure 4. Elimination of Mek1/2 Kinases Prevents Induction of NSCLCs by an Endogenous *K-Ras*^{G12V} Oncogene

(A) Survival of *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{+/+}; *Mek2*^{+/+} (n = 10) (open circles) and *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{lox/lox}; *Mek2*^{-/-} (n = 14) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age.

(B) Whole-mount X-Gal staining of lung sections collected from mice with the indicated genotypes 6 months after Ad-Cre treatment. β-Geo positive cells identified by X-Gal staining (blue color) correspond to cells expressing *K-Ras*^{G12V}. Scale bars, 5 mm.

(C) Number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{+/+}; *Mek2*^{+/+} (n = 6) (open bars) and *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{lox/lox}; *Mek2*^{-/-} (n = 8) (solid bars) mice. Error bars indicate mean ± SD. p values were calculated according to Student's t test.

(D) The top panel shows Southern blot analysis of genomic DNA isolated from individual tumors of *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{lox/lox}; *Mek2*^{-/-} mice 8 months after Ad-Cre treatment. DNAs were digested with HindIII and probed with a 680 bp DNA fragment obtained from a region downstream from the second loxP site. The migration of the unrecombined *Mek1*^{lox} allele (1.7 kbp) and the *Mek1*⁻ allele (1.5 kbp) is indicated by arrowheads. The bottom panel shows Western blot analysis of Mek1 and Mek2 expression in lysates obtained from individual tumors collected 8 months after Ad-Cre treatment of *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{+/+}; *Mek2*^{+/+} and *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{lox/lox}; *Mek2*^{-/-} mice. The presence of Mek1 in tumors of Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V}; *Mek1*^{lox/lox}; *Mek2*^{-/-} mice, due to partial cleavage of the *Mek1*^{lox} allele, indicates that Mek1 is essential for tumor development. Gapdh was used as loading control. Migration of the above proteins is indicated by arrowheads.

(E) Survival of *Mek1*^{+/+}; *Mek2*^{+/+}; *RERT*^{ert/ert} (n = 6) (open circles) and *Mek1*^{lox/lox}; *Mek2*^{-/-}; *RERT*^{ert/ert} (n = 6) (solid circles) mice fed ad libitum a tamoxifen-containing diet to activate the knocked in CreERT2 recombinase encoded by the *RERT*^{ert} alleles.

See also Figure S4.

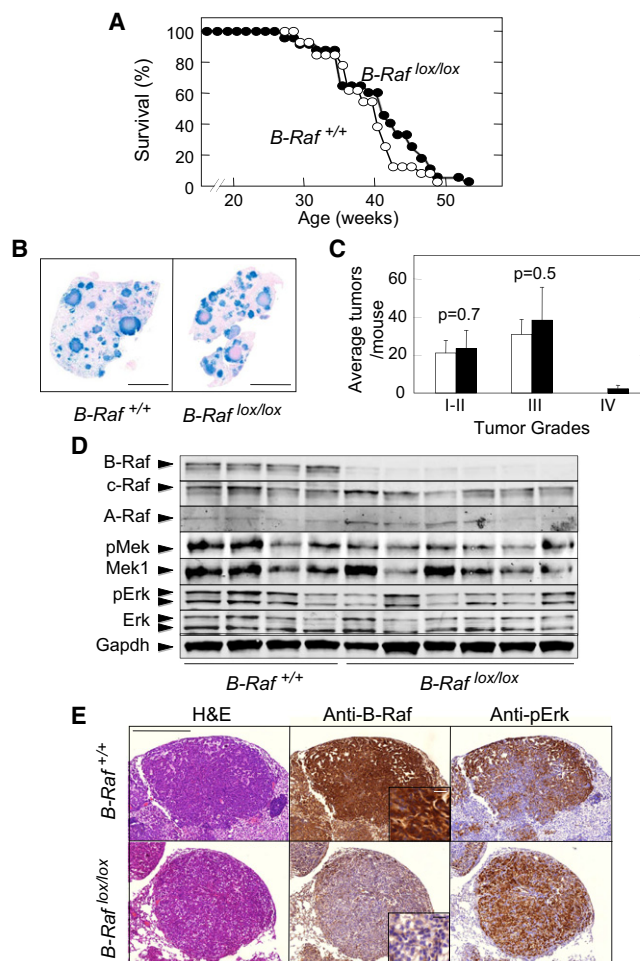


Figure 5. B-Raf Is Not Required for *K-Ras*^{G12V}-Induced NSCLCs in Mice

(A) Survival of *K-Ras*^{G12V}; *B-Raf*^{+/+} (n = 28) (open circles) and *K-Ras*^{G12V}; *B-Raf*^{lox/lox} (n = 25) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age.

(B) Whole-mount X-Gal staining of lung sections collected from mice with the indicated genotypes 6 months after Ad-Cre treatment. β-Geo positive cells identified by X-Gal staining (blue color) correspond to cells expressing *K-Ras*^{G12V}. Scale bars, 5 mm.

(C) Number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V}; *B-Raf*^{+/+} (n = 5) (open bars) and *K-Ras*^{G12V}; *B-Raf*^{lox/lox} (n = 5) (solid bars) mice. Error bars indicate mean ± SD. p values were calculated according to Student's t test.

(D) Western blot analysis of B-Raf, c-Raf, A-Raf, pMek, Mek1, pErk1/2, and Erk1/2 expression in lysates derived from individual tumors of the indicated genotype collected 8 months after Ad-Cre treatment. Gapdh was used as loading control. Migration of the above proteins is indicated by arrowheads.

(E) Tumors retained phosphorylated Erk expression in the absence of B-Raf. Hematoxylin and eosin (H&E) (left panels) and immunohistochemical staining of consecutive paraffin-fixed sections using anti-B-Raf (center panels) and anti-pErk (right panels) antibodies. Sections were obtained from lungs of Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V}; *B-Raf*^{+/+} (top panels) and *K-Ras*^{G12V}; *B-Raf*^{lox/lox} (bottom panels) mice. Insets show detail of larger areas. Scale bars, 0.5 mm (main field) and 0.02 mm (inset).

See also Figure S5.

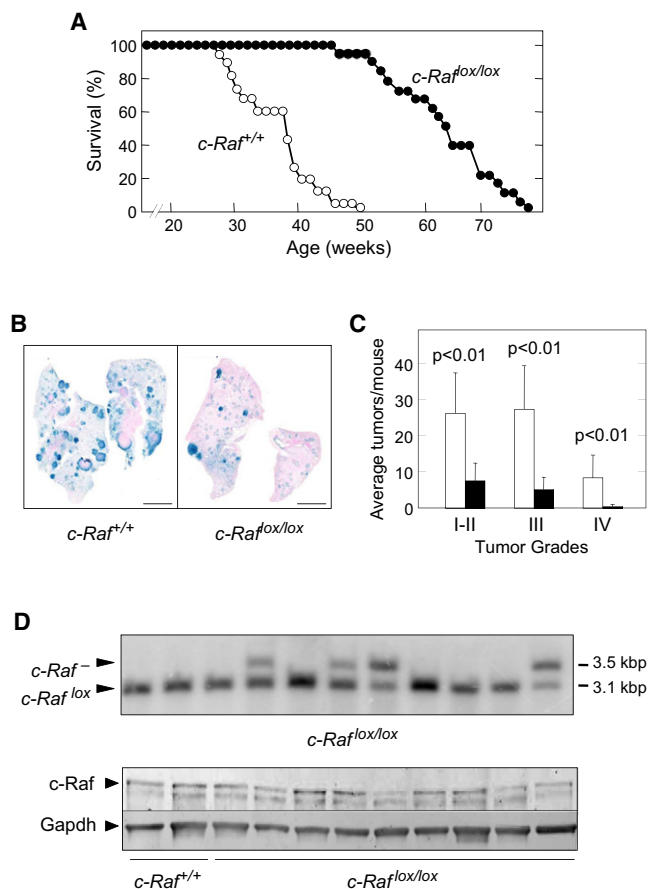


Figure 6. c-Raf Is Essential for *K-Ras*^{G12V}-Induced NSCLCs in Mice
 (A) Survival of *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{+/+} (n = 22) (open circles) and *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} (n = 23) (solid circles) mice treated with Ad-Cre at 8 weeks of age.
 (B) Whole-mount X-Gal staining of lung sections collected from mice with the indicated genotypes 6 months after Ad-Cre treatment. β -Geo positive cells identified by X-Gal staining (blue color) correspond to cells expressing *K-Ras*^{G12V}. Scale bars, 5 mm.
 (C) Number of tumors, classified by grade (I–IV), observed in *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{+/+} (n = 8) (open bars) and *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} (n = 8) (solid bars) mice. Error bars indicate mean \pm SD. p values were calculated according to Student's t test.
 (D) The top panel shows Southern blot analysis of DNA isolated from individual tumors obtained from *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice infected with Ad-Cre particles at 8 weeks of age. Tumor DNAs were digested with PstI. The sizes of the diagnostic DNA fragments for *c-Raf*^{lox} and *c-Raf*⁺ alleles are indicated. The bottom panel illustrates western blot analysis of c-Raf expression in lysates obtained from individual tumors collected 8 months after Ad-Cre treatment of *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{+/+} and *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice. The presence of c-Raf in tumors of Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice is due to incomplete cleavage of the *c-Raf*^{lox} allele. These results indicate that c-Raf is essential for tumor development. Gapdh was used as loading control. Migration of the above proteins is indicated by arrowheads. See also Figure S6.

further confirmed the absence of B-Raf expression in tumor tissue (Figure 5E). Interestingly, elimination of B-Raf expression had no effect on the levels of Mek and Erk phosphorylation, as determined by either western blot (Figure 5D) or immunohistochemical (Figure 5E) analysis. These observations suggest that in the absence of B-Raf, other Raf proteins can maintain

mitogenic signaling through the Mek/Erk pathway. This compensatory effect did not involve increased expression of the other Raf kinases (Figure 5D).

c-Raf Is Essential to Mediate Oncogenic Signaling in *K-Ras*^{G12V}-Driven NSCLCs

Next, we investigated whether c-Raf kinase was also dispensable for *K-Ras*^{G12V}-driven NSCLCs. Ad-Cre treated *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice survived significantly longer than the control cohort. Whereas 50% of *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{+/+} animals (n = 22) had to be sacrificed by 38 weeks of age, half of *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice (n = 23) were alive at 63 weeks. This difference represents an 83% increase in survival (Figure 6A). As expected, this increased survival was a direct consequence of the reduced number of tumors present in *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice 6 months after Ad-Cre treatment (Figures 6B and 6C). More importantly, each tumor tested (n = 11) retained *c-Raf*^{lox} alleles (Figure 6D). These results were confirmed by western blot analysis of nine independent tumors (Figure 6D). These observations indicate that NSCLCs driven by *K-Ras*^{G12V} cannot develop in the absence of c-Raf and that the tumors responsible for the death of the *K-Ras*^{G12V}; *c-Raf*^{lox/lox} mice must be “escapers,” as previously observed in mice lacking Erk1/2 and Mek1/2 kinases.

Systemic Depletion of c-Raf and B-Raf Kinases in Adult Mice Is Well Tolerated

To ascertain whether c-Raf expression was required for adult tissues, we fed 30-day-old *c-Raf*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} mice a tamoxifen diet for 3 months. Unlike mice deprived of Erk or Mek expression, *c-Raf*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} mice did not show loss of body weight or decreased activity during this period of time. None of the tissues obtained from mice sacrificed at the end of the dietary treatment displayed obvious anatomical defects (data not shown) despite efficient recombination of *c-Raf*^{lox} alleles in most organs (60%–100% excision) (Figure 7A). Brain tissue served as a negative control because tamoxifen crosses the blood-brain barrier rather inefficiently.

Available Raf kinase inhibitors display limited selectivity (Tsai et al., 2008), suggesting that they may result in systemic inhibition of all Raf kinases. Because A-Raf conditional mutant mice are not available, we investigated whether concomitant ablation of *B-Raf* and *c-Raf* loci in adult mice had deleterious consequences. *B-Raf*^{lox/lox}; *c-Raf*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} mice exposed to a tamoxifen diet for 3 months remained healthy and did not show weight loss or behavioral changes. Moreover, histological examination of 20 different tissues at the end of the treatment did not reveal detectable abnormalities (data not shown). These tissues displayed efficient recombination of the *B-Raf*^{lox} and/or *c-Raf*^{lox} alleles, ranging from 80% to 100% excision in the case of *B-Raf*^{lox} and 60% to 100% in the case of *c-Raf*^{lox} (Figure 7B). Brain tissue served as a negative control.

Analysis of these tissues for the expression of A-Raf indicated that this isoform is widely expressed, even in the absence of *B-Raf* and *c-Raf* alleles, thus suggesting that A-Raf may compensate for the absence of the other Raf isoforms (Figure S6). Interestingly, the levels of pMek and pErk showed significant variation from tissue to tissue. Yet, within a given tissue, we did not observe significant variation in the levels of Mek and Erk phosphorylation, regardless of the extent to which the *B-Raf* and

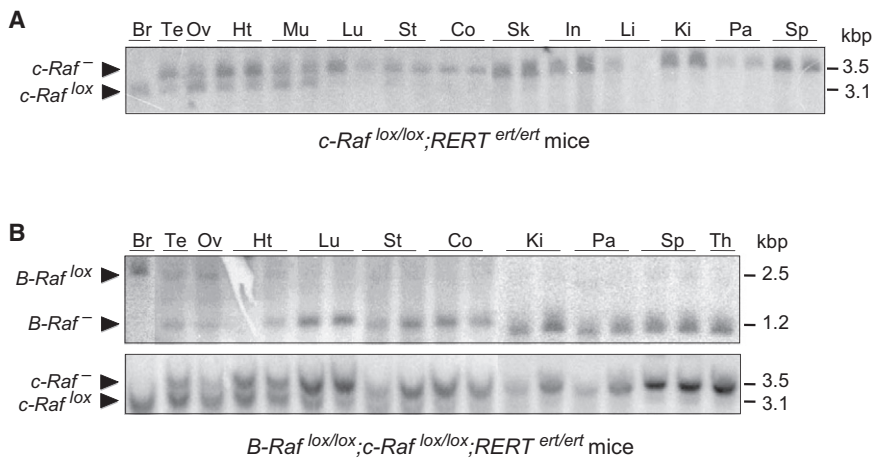


Figure 7. Adult Mice Tolerate Widespread Ablation of *B-Raf* and *c-Raf* Alleles

(A) Southern blot analysis of DNA isolated from tissues of *c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* mice fed ad libitum with a tamoxifen diet for 3 months (P30–P120). DNA was digested with PstI and probed with a 854 bp DNA fragment corresponding to sequences located in intron 4 downstream from the second loxP site. Migration of the ablated *c-Raf⁻* allele and the unrecombined *c-Raf^{lox}* allele is indicated by arrowheads. The sizes of the diagnostic DNA fragments for these alleles are also indicated. Whereas some tissues such as testis (Te), ovaries (Ov), heart (Ht), and muscle (Mu) display partial *c-Raf^{lox}* cleavage (from 50% to 70%), the majority of the tissues, including lung (Lu), stomach (St), colon (Co), skin (Sk), intestine (In), liver (Li), kidney (Ki), pancreas (Pa), and spleen (Sp), showed complete or almost

complete excision. Brain tissue (Br) served as negative control because tamoxifen crosses the brain-blood barrier with limited efficiency.

(B) Southern blot analysis of DNA isolated from tissues of *B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* mice fed ad libitum with a tamoxifen diet for 3 months (P30–P120). DNA samples were digested with HindIII and probed with a 422 bp DNA fragment corresponding to sequences located in intron 12 upstream from the first loxP site. Migration of the ablated *B-Raf⁻* and *c-Raf⁻* alleles as well as of the unrecombined *B-Raf^{lox}* and *c-Raf^{lox}* alleles is indicated by arrowheads. The sizes of the diagnostic DNA fragments for these alleles are also indicated. The top panel shows *B-Raf^{lox}* alleles that are almost completely recombined in lung (Lu), stomach (St), colon (Co), kidney (Ki), pancreas (Pa), spleen (Sp), and thymus (Th) and only partially cleaved in testis (Te), ovaries (Ov), and heart (Ht). The bottom panel illustrates *c-Raf^{lox}* alleles that were partially excised in testis (Te), ovaries (Ov), heart (Ht), lung (Lu), stomach (St), and colon (Co) and completely recombined in kidney (Ki), pancreas (Pa), spleen (Sp), and thymus (Th). Brain tissue (Br) served as negative control.

See also Figure S7.

c-Raf alleles had been ablated (Figure S6). These observations may explain the lack of defects observed in adult *B-Raf^{lox/lox};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* mice.

c-Raf Blocks *K-Ras* Oncogene Signaling in NSCLCs by a Mechanism Other than Inducing Senescence or Apoptosis

Next, we examined the mechanisms by which ablation of *c-Raf* impaired tumor development in response to *K-Ras^{G12V}* signaling. Expression of *K-Ras^{G12V}* in lung cells lacking Cdk4 induces an immediate senescence response that prevents cell proliferation (Puyol et al., 2010). However, lung sections of *K-Ras^{+G12V};c-Raf^{lox/lox}* mice did not display detectable senescent cells 4 weeks after turning on *K-Ras^{G12V}* expression, as determined by the absence of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining (Figure S7A). Similar results were obtained at an earlier time point of 2 weeks (data not shown). As a positive control, sections from *K-Ras^{+G12V};Cdk4^{-/-}* animals displayed SA- β -gal positive cells (Figure S7A).

It has been described that *c-Raf* protects cells from apoptosis (Mikula et al., 2001; Yamaguchi et al., 2004; Piazzolla et al., 2005; Matallanas et al., 2007). Thus, we reasoned that in the absence of *c-Raf*, *K-Ras^{G12V}* expression might lead to rapid apoptotic death of lung cells. However, lung sections of *K-Ras^{+G12V};c-Raf^{lox/lox}* mice taken 4 weeks after turning on *K-Ras^{G12V}* expression did not display detectable levels of active Caspase 3 (Figure S7B). Similar results were obtained at earlier time points (data not shown). These observations indicate that ablation of *c-Raf* expression did not result in increased apoptosis.

We have also examined the fate of *K-Ras^{G12V}* expressing cells upon ablation of *c-Raf^{lox}* alleles. To this end we took advantage of the expression of β -Geo as a surrogate marker for the *K-Ras^{G12V}* oncoprotein (Guerra et al., 2003). In this experiment, Cre recom-

binase activity was provided by the *RERT^{ert/ert}* alleles instead of Ad-Cre to avoid inducing an inflammatory response that may interfere with detection of β -Geo expression. As illustrated in Figure S7C, *K-Ras^{+G12V};c-Raf^{+/+};RERT^{ert/ert}* and *K-Ras^{+G12V};c-Raf^{lox/lox};RERT^{ert/ert}* mice displayed the same number of *K-Ras^{G12V}* positive cells (based on the surrogate β -Geo expression) 15 days after 4OHT exposure, suggesting that loss of *c-Raf* expression did not induce death of *K-Ras^{G12V}*-containing lung cells. Moreover, the number of *K-Ras^{G12V}* positive cells remained constant 2 weeks later despite lacking *c-Raf*. These observations suggest that elimination of *c-Raf* does not result in death of *K-Ras^{G12V}*-expressing lung cells.

We have recently shown that ablation of *c-Raf* in skin tumors driven by constitutive activation of the Ras-GEF, SOS, resulted in tumor disappearance due to increased terminal differentiation of tumor cells (Ehrenreiter et al., 2009). These effects were mediated by the synchronous activation of the Rok kinase upon *c-Raf* ablation (Ehrenreiter et al., 2009). Unfortunately, more than 30% of lung cells, regardless of genotype, had an active Rok kinase, as determined by the presence of phosphorylated Cofilin, a downstream target of this kinase (data not shown). Thus, it was not possible to determine whether the lack of proliferation of lung cells deprived of *c-Raf* was mediated by Rok activation.

K-Ras Signals through B-Raf and c-Raf in Mouse Embryonic Fibroblasts and in Human NSCLC Cell Lines

We have also explored whether the requirement of *c-Raf* for *K-Ras^{G12V}* signaling was cell type dependent. Cultures of primary MEFs from E13.5 *K-Ras^{+G12V};RERT^{ert/ert}* embryos carrying *B-Raf^{lox}* and *c-Raf^{lox}* alleles, either individually or in combination ($n = 3$), were exposed to 4OHT for 5 days to activate the resident CreERT2 recombinase to induce *K-Ras^{G12V}*

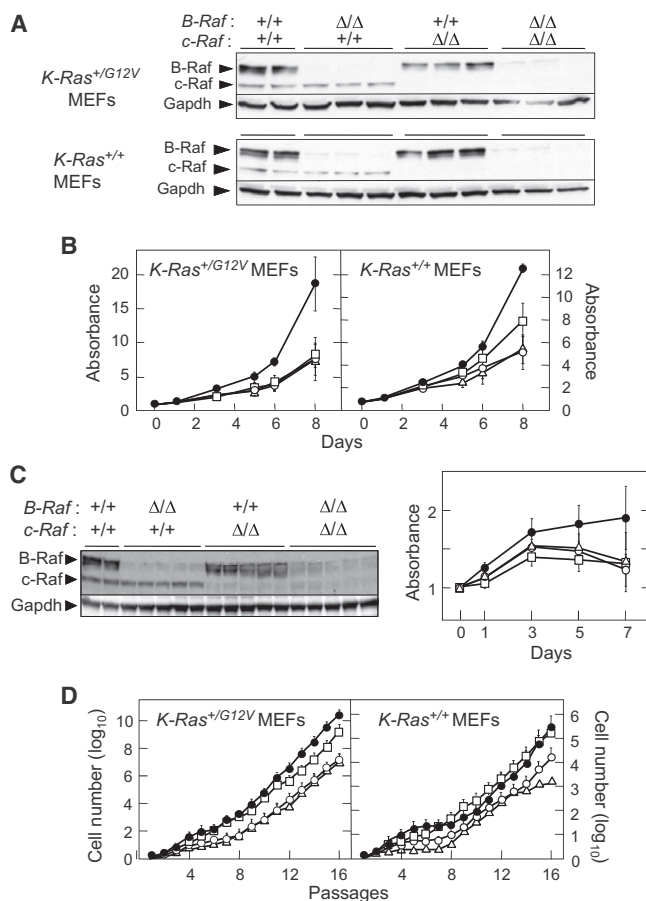


Figure 8. B-Raf and c-Raf Are Not Essential for Proliferation and Immortalization of Primary MEFs Driven by Wild-Type or Oncogenic K-Ras Signaling

(A) Western blot analysis of B-Raf and c-Raf protein expression in primary MEFs derived from (top panel) three independent K-Ras^{+/G12V}; RERT^{ert/ert}, K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert}, K-Ras^{+/G12V}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert}, and K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{Δ/Δ}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} embryos, and (bottom panel) three independent K-Ras^{+/+}; RERT^{ert/ert}, K-Ras^{+/+}; B-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert}, K-Ras^{+/+}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert}, and K-Ras^{+/+}; B-Raf^{Δ/Δ}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} embryos. These MEFs were incubated in DMEM supplemented with 10% FBS in the presence of 4OHT for 5 days to activate expression of the resident K-Ras^{+/G12V} oncogene and to eliminate the c-Raf^{lox} (c-Raf^Δ) and/or B-Raf^{lox} (B-Raf^Δ) conditional alleles. Gapdh served as loading control. Migration of the corresponding proteins is indicated by arrowheads.

(B) Growth curves of the primary MEFs (n = 3) described above. MEFs were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 600 nM 4OHT for 5 days before seeding. Results are shown in arbitrary absorbance units. Left panel shows K-Ras^{+/G12V}; RERT^{ert/ert} (solid circles), K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open squares), K-Ras^{+/G12V}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open circles), and K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{Δ/Δ}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open triangles). Right panel illustrates K-Ras^{+/+}; RERT^{ert/ert} (solid circles), K-Ras^{+/+}; B-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open squares), K-Ras^{+/+}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open circles), and K-Ras^{+/+}; B-Raf^{Δ/Δ}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open triangles). Error bars indicate mean ± SD.

(C) The left panel shows western blot analysis of B-Raf and c-Raf protein expression in primary MEFs derived from five independent K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}, K-Ras^{+/G12V}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}, and K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{lox/lox}; c-Raf^{lox/lox}; RERT^{ert/ert} embryos. Samples from two K-Ras^{+/G12V}; RERT^{ert/ert} embryos are also shown. MEFs were incubated in DMEM supplemented with 2% FBS in the presence of 4OHT for 5 days to activate expression of the resident K-Ras^{+/G12V} oncogene and to eliminate the c-Raf^{lox} (c-Raf^Δ) and/or B-Raf^{lox} (B-Raf^Δ) conditional alleles. Gapdh served as loading control.

expression and to ablate the conditional B-Raf and c-Raf alleles (Figure 8A). Inhibition of c-Raf expression partially decreased but did not eliminate proliferation of K-Ras^{G12V}-expressing primary MEFs (Figure 8B). Similar results were obtained when we inhibited B-Raf expression. Moreover, concomitant inhibition of both proteins did not result in synergistic or additive effects (Figure 8B). Similar results were obtained using limiting serum conditions (2% fetal bovine serum [FBS]) (Figure 8C). The partial requirement of B-Raf and c-Raf expression for proper proliferation was not unique to MEFs expressing K-Ras oncogenes. In agreement with previous observations, wild-type MEFs also required c-Raf for optimal proliferation (Mikula et al., 2001). Elimination of c-Raf and B-Raf, either alone or in combination, also resulted in partial inhibition of their proliferative properties (Figure 8B).

We also examined whether B-Raf and c-Raf kinases were required for immortalization of primary MEFs (Guerra et al., 2003; Tuveson et al., 2004). Inhibition of B-Raf had little, if any, effect on the immortalization rate of K-Ras^{G12V}-expressing MEFs and did not induce proliferative senescence. Inhibition of c-Raf, either alone or in combination with B-Raf, did not affect the immortalization rate (Figure 8D). MEFs expressing wild-type K-Ras underwent the expected proliferative senescence. This process was exacerbated by inhibition of c-Raf, but not of B-Raf (Figure 8D). However, these MEFs became immortal after a few passages regardless of whether they lacked c-Raf alone or c-Raf plus B-Raf. These results indicate that neither B-Raf nor c-Raf proteins are essential for proliferation or immortalization of MEFs, regardless of whether they expressed normal or oncogenic K-Ras proteins.

Finally, we examined the effect of knocking down c-RAF and B-RAF expression in human NSCLC cell lines containing K-RAS oncogenes. To this end we selected four cell lines, A549, H23, H358, and H441, of which only the last two have shown a strong dependency ("addiction") on K-RAS oncogenes (Singh et al., 2009). As illustrated in Figure S8, the extent of ERK phosphorylation was not significantly affected by knock down of c-RAF or B-RAF expression. However, inhibition of c-RAF or B-RAF affected their proliferation rate, although this inhibition appeared to be unrelated to the relative addiction of these cell lines to K-RAS oncogene expression. Moreover, as illustrated above for MEFs, knock down of c-RAF and B-RAF had a similar inhibitory effect on the proliferation rate of each of the respective NSCLC cell lines (Figure S8). These observations indicate that the exquisite requirement for c-Raf expression observed in the K-Ras^{G12V}-driven NSCLC tumor model reported here might not be a general property of K-Ras signaling. Alternatively, inhibition of c-Raf and B-Raf expression may have different consequences under in vitro growth conditions.

Migration of the corresponding proteins is indicated by arrowheads. The right panel shows growth curves of the primary MEFs (n = 5) described above. MEFs were grown in DMEM supplemented with 2% FBS and 600 nM 4OHT. K-Ras^{+/G12V}; RERT^{ert/ert} (solid circles), K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open squares), K-Ras^{+/G12V}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open circles), and K-Ras^{+/G12V}; B-Raf^{Δ/Δ}; c-Raf^{Δ/Δ}; RERT^{ert/ert} (open triangles). Error bars indicate mean ± SD.

See also Figure S8.

DISCUSSION

K-RAS oncogenes signal through a cascade of downstream effectors, most of which are druggable kinases. Yet, to our knowledge, there are no approved targeted therapies to treat *K-RAS*-driven NSCLC. This situation may stem from our limited knowledge of what effectors are directly responsible for mediating *K-RAS* signaling in this tumor type and, hence, serve as effective therapeutic targets. As illustrated in this study, each one of the two Erk kinases, Erk1 or Erk2, is sufficient to allow initiation of *K-Ras*-induced NSCLC. However, *K-Ras* oncogenes could not transform lung cells in the absence of both Erk kinases. Unfortunately, widespread loss of the Erk1/2 kinases resulted in severe toxicity that led to the rapid death of the animal even when only a limited percentage of cells (ranging from 40% to 60% depending on the tissue type) lost both Erk kinases. Yet, a single *Erk* allele was sufficient to sustain normal adult homeostasis. Hence, limited inhibition of ERK kinase activity within a tolerated therapeutic window may provide a successful pharmacological approach to treat *K-RAS*-positive NSCLC.

Similar results were observed when we targeted the Mek kinases. Both Mek1 and Mek2 efficiently sustained *K-Ras* oncogenic signaling in the absence of the other isoform. These results differed from those observed with DMBA-induced skin tumors in which Mek2 could not compensate for the absence of Mek1 (Scholl et al., 2009), further illustrating that the contribution of individual members of the Ras/Mek/Erk pathway is likely to be cell type dependent. Moreover, complete loss of Mek kinases prevented *K-Ras*-driven NSCLC development. Unfortunately, as discussed above for their downstream Erk kinases, widespread loss of Mek1/2 kinases was incompatible with life. Dual MEK1/2 inhibitors have already been tested in early-phase clinical trials. Early inhibitors including CI-1040, AZD6244, and PD0325901 showed no significant antitumor activity at the permissible doses in a series of solid tumors, including advanced NSCLCs (Rinehart et al., 2004; Hainsworth et al., 2010; Haura et al., 2010). Recently, a more potent MEK inhibitor, GSK1120212, active on B-RAF-driven human melanoma cell lines (Villanueva et al., 2010), has yielded 2 partial responses and 9 disease stabilizations in 14 patients suffering from *K-Ras* oncogene-positive NSCLC (<http://www.esmo.org/events/milan-2010-congress>). These results suggest that MEK inhibition may yield therapeutic benefit to patients with NSCLC.

The immediate Ras downstream effectors within the Raf/Mek/Erk pathway are the Raf kinases, A-Raf, B-Raf, and c-Raf. B-Raf was completely dispensable for *K-Ras* oncogenic signaling, at least within the context of NSCLC. Moreover, phosphorylation of Erk proteins within the tumor appeared to be unaffected, suggesting that other Raf kinases mediate *K-Ras* oncogenic signaling in the absence of B-Raf. However, in this case the compensatory effects of c-Raf (and/or A-Raf) on B-Raf were not reciprocal. Elimination of c-Raf from *K-Ras*^{G12V}-expressing lung cells completely inhibited tumor development. Thus, neither B-Raf nor A-Raf could compensate for the lack of c-Raf. Because *K-Ras* is the Ras isoform that binds and activates c-Raf more efficiently (Voice et al., 1999), it is possible that c-Raf might be essential to mediate *K-Ras* signaling to the Mek and Erk kinases, at least in an oncogenic setting. Indeed, oncogenic RAS exclusively signaled via c-RAF to the ERK-MAPK

pathway in human melanoma cell lines (Dumaz et al., 2006). However, it is also possible that c-Raf, but not B-Raf or A-Raf, may modulate an alternative downstream pathway essential for malignant transformation (Takezawa et al., 2009), but not for normal homeostasis. This hypothesis may also help to explain why elimination of c-Raf is not deleterious for adult mice.

The existence of c-Raf-dependent, Mek-independent pathways in *K-Ras* oncogene-induced tumors has been invoked before (Haigis et al., 2008). More recently, such a pathway has been shown to be essential for the development and maintenance of Ras-driven epidermal tumors (Ehrenreiter et al., 2009). In particular, loss of c-Raf in established tumors expressing a membrane-tagged SOS exchange factor induced a massive increase in terminal differentiation of the tumor cells accompanied by a sharp decline in cell proliferation, two events that resulted in tumor regression. Terminal differentiation of these SOS-expressing keratinocytes in the absence of c-Raf was mediated by activation of the Rok pathway (Ehrenreiter et al., 2009), a pathway that is normally inhibited by c-Raf via direct interaction with Rok (Niault et al., 2009). Unfortunately, the limited number of *K-Ras*^{G12V}-expressing cells and their inability to expand in the absence of c-Raf made it impossible for us to investigate the molecular events that prevent tumor development. If c-Raf mediates *K-Ras*^{G12V} signaling via protein-protein interaction with Rok or other substrates, therapeutic intervention will require strategies other than inhibition of c-Raf catalytic activity. Recent studies have suggested that different mutations in *K-RAS* may result in different clinical outcomes (De Roock et al., 2010). Whether these differences may result from different interactions with Ras effectors remains to be determined.

RAF inhibitors with activity against B-RAF and c-RAF kinases are potent inhibitors of tumors carrying a mutated B-RAF^{V600E} oncogene. However, these inhibitors activate the MEK-ERK pathway in tumors carrying mutant *K-RAS* or wild-type *RAS*/RAF molecules by a mechanism involving transactivation of one protomer in RAF homodimers and heterodimers (Hatzivassiliou et al., 2010; Poulikakos et al., 2010). Moreover, Heidorn et al. (2010) have illustrated that a kinase-dead B-Raf induces melanomas in the presence of an endogenous *K-Ras* oncogene. Finally, patients with melanoma treated with B-RAF inhibitors develop cutaneous squamous cell carcinomas at significant frequency (Bollag et al., 2010; Flaherty et al., 2010). Whether similar results will be observed with c-RAF selective inhibitors remains to be determined. Current efforts aimed at generating mice expressing an inducible kinase-dead c-Raf protein may also help to shed some light on this issue.

Recently, the use of synthetic lethal approaches with *K-Ras*-driven NSCLC mouse tumor models has allowed the identification of novel therapeutic targets, including the NF- κ B pathway and Cdk4 (Meylan et al., 2009; Puyol et al., 2010). Ablation of Cdk4 expression in *K-Ras* oncogene containing lung cells elicited an immediate senescence response that prevented tumor initiation and progression (Puyol et al., 2010). Such response did not appear to be responsible for the lack of proliferation of *K-Ras* oncogene expressing cells in the absence of c-Raf. Thus, it is possible that c-Raf and Cdk4 inhibitors may inhibit proliferation of NSCLC cells by different mechanisms, thus resulting in synergistic antitumor effects.

Finally, it will be important to develop tumor models that address the effect of inhibiting these downstream effectors on tumor maintenance rather than on tumor development. Replacement of the Cre-lox strategy used in this study to activate *K-Ras*^{G12V} expression by the Flpe-*frt* recombinase system will allow temporal separation of tumor initiation and therapeutic intervention. Results derived from these studies are likely to provide more relevant information toward the development of effective targeted therapies for the treatment of *K-Ras* oncogene-driven NSCLC.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

K-Ras^{+/-LSLG12V_{Geo}} (Guerra et al., 2003), *RERT*^{ert/ert} (Guerra et al., 2003), *Erk1*^{-/-} (Pagès et al., 1999), *Erk2*^{lox/lox} (Fischer et al., 2005), *Mek1*^{lox/lox} (Catalanotti et al., 2009), *Mek2*^{-/-} (Belanger et al., 2003), *B-Raf*^{lox/lox} (Chen et al., 2006), and *c-Raf*^{lox/lox} (Jesenberger et al., 2001) strains have been previously described. All animal experiments were approved by the Ethical Committee of the CNIO and performed in accordance with the guidelines stated in the *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). All strains were genotyped by Transnetix (Cordova, TN, USA).

Adenovirus Intratracheal Infection

Eight to 10-week-old mice were treated once by intratracheal adeno-Cre instillation with 2.5×10^8 pfu/mouse of virus after anesthesia (i.p. injection of ketamine 75 mg/kg, xylazine 12 mg/kg) (Simpson et al., 2001).

Histopathology and Immunohistochemistry

For routine histological study, lung lobes were fixed in 10% buffered formalin (Sigma) and embedded in paraffin. For quantification and classification of tumor lesions, lung lobes were processed for whole-mount X-Gal staining to detect β -Geo, as a surrogate marker for *K-Ras*^{G12V} expression (Guerra et al., 2003). Stained tissues were embedded in paraffin, serially sectioned, and tumors counted and classified according to standard histopathological grading (Jackson et al., 2005). Antibodies used for immunostaining included those raised against: B-Raf (Abcam; ab33899); pErk (Cell Signaling Technology; 9101); pCofilin (Santa Cruz Biotechnology; sc-21867-R); and active Caspase3 (R&D Systems; AF835). For endogenous SA- β -gal detection, lung lobes were snap-frozen in O.C.T. (Sakura) and processed on 10 μ m cryostat sections with a SA- β -gal staining kit (Cell Signaling Technology) in accordance with the manufacturer's recommendations. Counterstaining of cryostat sections was performed with nuclear fast red.

Western Blot Analysis

Thirty micrograms of protein extracts obtained from either tumor tissue or cell extracts were separated on SDS/PAGE gels (Bio-Rad), transferred to a nitrocellulose membrane, and blotted with antibodies raised against B-Raf (Santa Cruz Biotechnology; sc-5284), c-Raf (BD Biosciences; 610151), A-Raf (Abcam; ab19880), Mek1 (Santa Cruz Biotechnology; sc-219), Mek2 (BD Biosciences; 610235), pMek (Cell Signaling Technology; 9154), Erk (Santa Cruz Biotechnology; sc-93), pErk (Cell Signaling Technology; 9101), Rsk (Santa Cruz Biotechnology; sc-231), pRsk (Cell Signaling Technology; 9341), and Gapdh (Sigma; G8795). Primary antibodies were detected with goat secondary antibodies directed against mouse or rabbit IgGs (Alexa Fluor 680; Invitrogen) and visualized with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Cell Culture Assays

MEFs were isolated from E13.5 embryos and propagated according to standard 3T3 protocols. All experiments were carried out in the presence of 600 nM 4OHT (Sigma). For proliferation assays, MEFs were treated for 5 days with 4OHT to ablate the conditional *B-Raf*^{lox} and *c-Raf*^{lox} alleles, seeded on 96-well plates (1000 cells/well) in triplicate in DMEM supplemented with 10% FBS, and their growth rate was determined by the MTT cell proliferation

kit (Roche). Human NSCLC cell lines were purchased from the ATCC. Cells were infected with MISSION shRNAs directed against B-RAF or c-RAF (Sigma). Scrambled shRNA was used as control. Cells were selected with puromycin (2 μ g/ml) for 5 days before seeding. For proliferation assays cells were seeded on 96-well plates (1000 cells/well) in RPMI medium supplemented with 10% FBS and puromycin, and their growth rate was determined by the MTT cell proliferation kit.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes eight figures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.ccr.2011.04.002.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Florian A. Karreth, David A. Tuveson (Cambridge Research Institute), Christopher Murriel, David Davis, and Leisa Johnson (Genentech, Inc.) for sharing their results with us prior to publication. The generosity of Alcino J. Silva (UCLA) (*B-Raf*^{lox/lox} mice), Stephen M. Hedrick (UCSD) (*Erk2*^{lox/lox} mice), and Gilles Pagès and Jacques Pouyssegur (University of Nice Sophia Antipolis) (*Erk1*^{-/-} strain) for making their mice available to us, is much appreciated. We also thank M. San Román and R. Villar (Experimental Oncology), M. Lamparero and I. Aragón (Animal Facility), and V. Alvarez, E. Gil, M. Gómez, P. González, and N. Matesanz (Comparative Pathology) for excellent technical assistance. Work in the laboratory of M.Bar. is supported by grants from the EU-Framework Programme (LSHG-CT-2007-037665), European Research Council (250297-RAS AHEAD), Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2006-11773 and CSD2007-00017), Autonomous Community of Madrid (GR/SAL/0587/2004 and S2006/BIO-0232), and *Fundación de la Mutua Madrileña del Automovil*. Work in the M.Bac. laboratory is supported by the Austrian Scientific Research Fund (SEB 021) and by a grant from the EU (GROWTHSTOP). J.C. is supported by a Canadian Institutes of Health Research grant (MOP-97801). R.B.B. is supported by a BEFI grant from the *Fondo de Investigaciones Sanitarias* and S.F. by a FEBS Long-Term Fellowship and a Sara Borrell grant from the *Instituto de Salud Carlos III*.

Received: October 6, 2010

Revised: January 27, 2011

Accepted: April 1, 2011

Published online: April 21, 2011

REFERENCES

- Barbie, D.A., Tamayo, P., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Moody, S.E., Dunn, I.F., Schinzel, A.C., Sandy, P., Meylan, E., Scholl, C., et al. (2009). Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 462, 108–112.
- Belanger, L.F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A.M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4778–4787.
- Bissonauth, V., Roy, S., Gravel, M., Guillemette, S., and Charron, J. (2006). Requirement for Mak2k1 (Mek1) in extra-embryonic ectoderm placentogenesis. *Development* 133, 3429–3440.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467, 596–599.
- Camonis, J.H., and White, M.A. (2005). Raf GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol.* 15, 327–332.
- Catalanotti, F., Reyes, G., Jesenberger, V., Galabova-Kovacs, G., de Matos Simoes, R., Carugo, O., and Baccarini, M. (2009). A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 294–303.
- Chen, A.P., Ohno, M., Giese, K.P., Kühn, R., Chen, R.L., and Silva, A.J. (2006). Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. *J. Neurosci. Res.* 83, 28–38.

- Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6, 184–192.
- De Roock, W., Jonker, D.J., Di Nicolantonio, F., Sartore-Bianchi, A., Tu, D., Siena, S., Lamba, S., Arena, S., Frattini, M., Piessevaux, H., et al. (2010). Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304, 1812–1820.
- Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J.A., Bastian, B.C., Springer, C., and Marais, R. (2006). In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res.* 66, 9483–9491.
- Ehrenreiter, K., Kern, F., Velamoor, V., Meissl, K., Galabova-Kovacs, G., Sibilia, M., and Baccarini, M. (2009). Raf-1 addiction in ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 16, 149–160.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–619.
- Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., et al. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat. Med.* 14, 1351–1356.
- Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pagès, G., Pouyssegur, J., and Hedrick, S.M. (2005). The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 23, 431–443.
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., and Chapman, P.B. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 809–819.
- Galabova-Kovacs, G., Kolbus, A., Matzen, D., Meissl, K., Piazzolla, D., Rubiolo, C., Steinitz, K., and Baccarini, M. (2006). ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 5, 1514–1518.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., et al. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr. Biol.* 9, 369–372.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111–120.
- Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J. (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* 129, 957–968.
- Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., et al. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat. Genet.* 40, 600–608.
- Hainsworth, J.D., Cebotaru, C.L., Kanarev, V., Ciuleanu, T.E., Damyranov, D., Stella, P., Ganchev, H., Pover, G., Morris, C., and Tzekova, V. (2010). A phase II, open-label, randomized study to assess the efficacy and safety of AZD6244 (ARRY-142886) versus pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *J. Thorac. Oncol.* 5, 1630–1636.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., et al. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431–435.
- Haura, E.B., Ricart, A.D., Larson, T.G., Stella, P.J., Bazhenova, L., Miller, V.A., Cohen, R.B., Eisenberg, P.D., Selaru, P., Wilner, K.D., et al. (2010). A phase II study of PD-0325901, an oral MEK inhibitor, in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 2450–2457.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Noury, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., and Marais, R. (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140, 209–221.
- Jackson, E.L., Olive, K.P., Tuveson, D.A., Bronson, R., Crowley, D., Brown, M., and Jacks, T. (2005). The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer Res.* 65, 10280–10288.
- Jessenberger, V., Procyk, K.J., Ruth, J., Schreiber, M., Theussl, H.C., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J. Exp. Med.* 193, 353–364.
- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R.T., Crowley, D., Tuveson, D.A., and Jacks, T. (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410, 1111–1116.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 517–531.
- Luo, J., Emanuele, M.J., Li, D., Creighton, C.J., Schlabach, M.R., Westbrook, T.F., Wong, K.K., and Elledge, S.J. (2009). A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* 137, 835–848.
- Malliri, A., and Collard, J.G. (2003). Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 583–589.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.
- Marshall, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 82–89.
- Matallanas, D., Romano, D., Yee, K., Meissl, K., Kuceroval, L., Piazzolla, D., Baccarini, M., Vass, J.K., Kolch, W., and O'Neill, E. (2007). RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol. Cell* 27, 962–975.
- Meylan, E., Dooley, A.L., Feldser, D.M., Shen, L., Turk, E., Ouyang, C., and Jacks, T. (2009). Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462, 104–107.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kuceroval, L., Rütth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J.* 20, 1952–1962.
- Niault, T., Sobczak, I., Meissl, K., Weitsman, G., Piazzolla, D., Maurer, G., Kern, F., Ehrenreiter, K., Hamerl, M., Moarefi, I., et al. (2009). From autoinhibition to inhibition in trans: the Raf-1 regulatory domain inhibits Rok-alpha kinase activity. *J. Cell Biol.* 187, 335–342.
- Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374–1377.
- Piazzolla, D., Meissl, K., Kuceroval, L., Rubiolo, C., and Baccarini, M. (2005). Raf-1 sets the threshold of Fas sensitivity by modulating Rok-alpha signaling. *J. Cell Biol.* 171, 1013–1022.
- Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427–430.
- Puyol, M., Martín, A., Dubus, P., Mulero, F., Pizcueta, P., Khan, G., Guerra, C., Santamaria, D., and Barbacid, M. (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 18, 63–73.
- Rinehart, J., Adjei, A.A., Lorusso, P.M., Waterhouse, D., Hecht, J.R., Natale, R.B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E.P., et al. (2004). Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 4456–4462.
- Scholl, F.A., Dumesic, P.A., Barragan, D.I., Harada, K., Charron, J., and Khavari, P.A. (2009). Selective role for Mek1 but not Mek2 in the induction of epidermal neoplasia. *Cancer Res.* 69, 3772–3778.
- Simpson, A.J., Wallace, W.A., Marsden, M.E., Govan, J.R., Porteous, D.J., Haslett, C., and Sallenave, J.M. (2001). Adenoviral augmentation of elafin

protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection. *J. Immunol.* 167, 1778–1786.

Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., and Settleman, J. (2009). A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 15, 489–500.

Takezawa, K., Okamoto, I., Yonesaka, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Fukuoka, M., and Nakagawa, K. (2009). Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res.* 69, 6515–6521.

Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., et al. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3041–3046.

Tuveson, D.A., Shaw, A.T., Willis, N.A., Silver, D.P., Jackson, E.L., Chang, S., Mercer, K.L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., et al. (2004). Endogenous

oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5, 375–387.

Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18, 683–695.

Voice, J.K., Klemke, R.L., Le, A., and Jackson, J.H. (1999). Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* 274, 17164–17170.

Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsani, S., Asahi, M., Taniike, M., et al. (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Invest.* 114, 937–943.

Supplemental Information

c-Raf, but Not B-Raf, Is Essential for Development of *K-Ras* Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Carcinoma

**Rafael B. Blasco, Sarah Francoz, David Santamaría, Marta Cañamero, Pierre
Dubus, Jean Charron, Manuela Baccarini, and Mariano Barbacid**

INVENTORY

Figure S1 is related to Figure 1.
Figure S2 is related to Figure 2.
Figure S3 is related to Figure 3.
Figure S4 is related to Figure 4.
Figure S5 is related to Figure 5.
Figure S6 is related to Figure 6.
Figure S7 is related to Figure 7.
Figure S8 is related to Figure 8.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

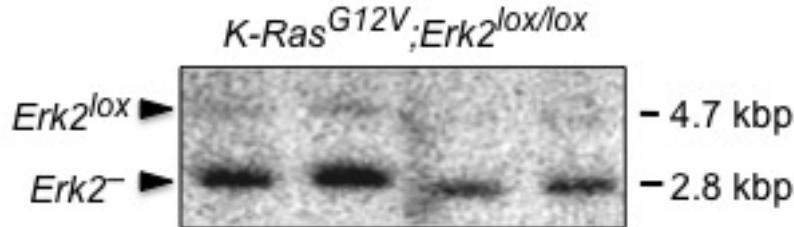


Figure S1. Related to Figure 1. Southern blot analysis of DNA isolated from individual tumors obtained from *K-Ras^{+G12V}; Erk2^{lox/lox}* mice infected with Ad-Cre particles at 8 weeks of age.

Tumor DNAs were digested with KpnI. The sizes of the diagnostic DNA fragments for *Erk2^{lox}* and *Erk2⁻* alleles are indicated.

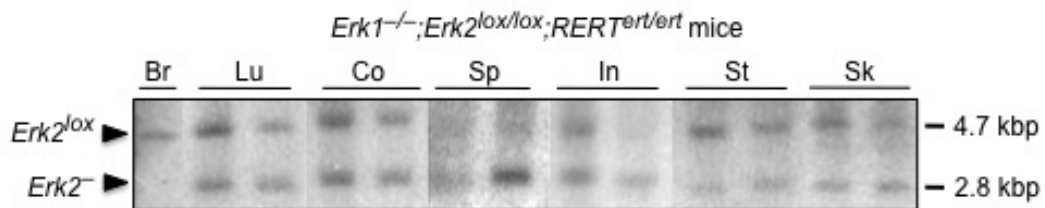


Figure S2. Related to Figure 2. Systemic ablation of *Erk* alleles is not compatible with life in adult mice.

Southern blot analysis of DNA isolated from tissues of *Erk1^{-/-}; Erk2^{lox/lox}; RERT^{ert/ert}* mice fed *ad libitum* with a tamoxifen diet since P30. Mice were sacrificed at humane end-point. Migration of the unrecombined *Erk2^{lox}* allele and the ablated *Erk2⁻* allele is indicated by arrowheads. Tissues analyzed include brain (B), lung (Lu), colon (Co), spleen (Sp), small intestine (In), stomach (St) and skin (Sk).

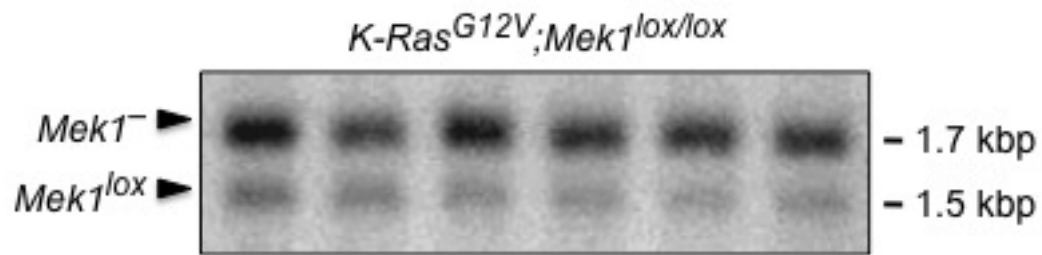


Figure S3. Related to Figure 3. Southern blot analysis of DNA isolated from individual tumors obtained from *K-Ras^{+G12V};Mek1^{lox/lox}* mice infected with Ad-Cre particles at 8 weeks of age.

Tumor DNAs were digested with HindIII. The sizes of the diagnostic DNA fragments for *Mek1^{lox}* and *Mek1⁻* alleles are indicated.

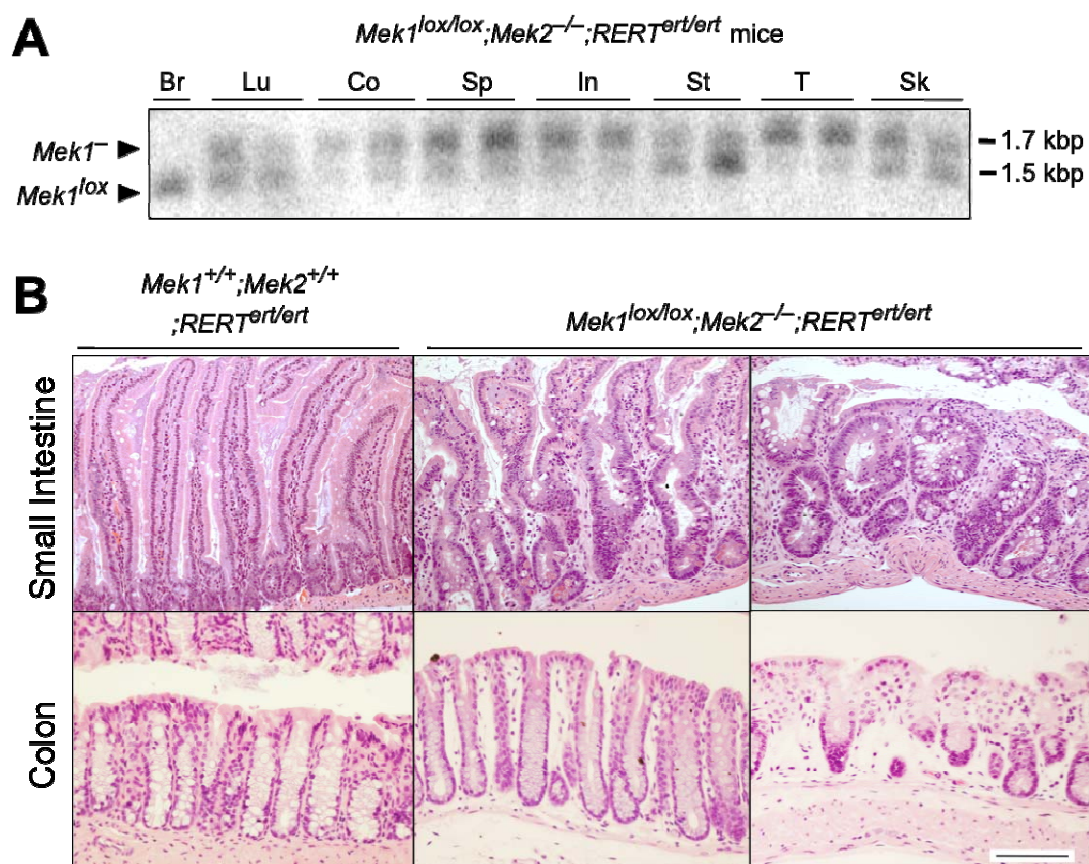


Figure S4. Related to Figure 4. Systemic ablation of *Mek* alleles is not compatible with life in adult mice.

(A) Southern blot analysis of DNA isolated from tissues of *Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-};RERT^{ert/ert}* mice fed *ad libitum* with a tamoxifen diet since P30. Mice were sacrificed at humane end-point. Migration of the unrecombined *Mek1^{lox}* allele and the ablated *Mek1⁻* allele is indicated by arrowheads. Tissues analyzed include brain (B), lung (Lu), colon (Co), spleen (Sp), small intestine (In), stomach (St), tail (T) and skin (Sk).

(B) H&E staining of paraffin sections from small intestine and colon tissue obtained from *Mek1^{+/+};Mek2^{+/+};RERT^{ert/ert}* and *Mek1^{lox/lox};Mek2^{-/-};RERT^{ert/ert}* mice fed *ad libitum* with a tamoxifen-containing diet to activate the knocked in CreERT2 recombinase encoded by the *RERT^{ert}* alleles. Scale bar, 100μm.

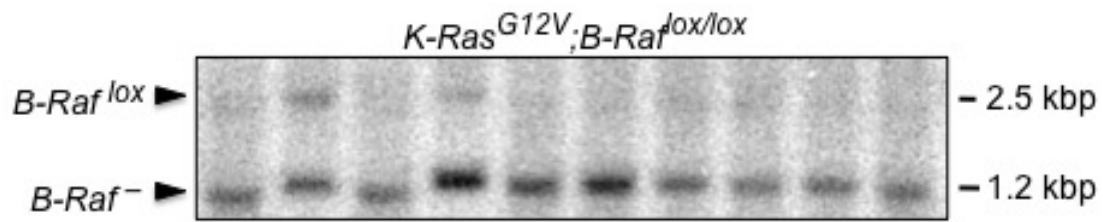


Figure S5. Related to Figure 5. Southern blot analysis of DNA isolated from individual tumors obtained from $K-Ras^{+/G12V};B-Raf^{lox/lox}$ mice infected with Ad-Cre particles at 8 weeks of age.

Tumor DNAs were digested with HindIII. The sizes of the diagnostic DNA fragments for $B-Raf^{lox}$ and $B-Raf^{-}$ alleles are indicated.

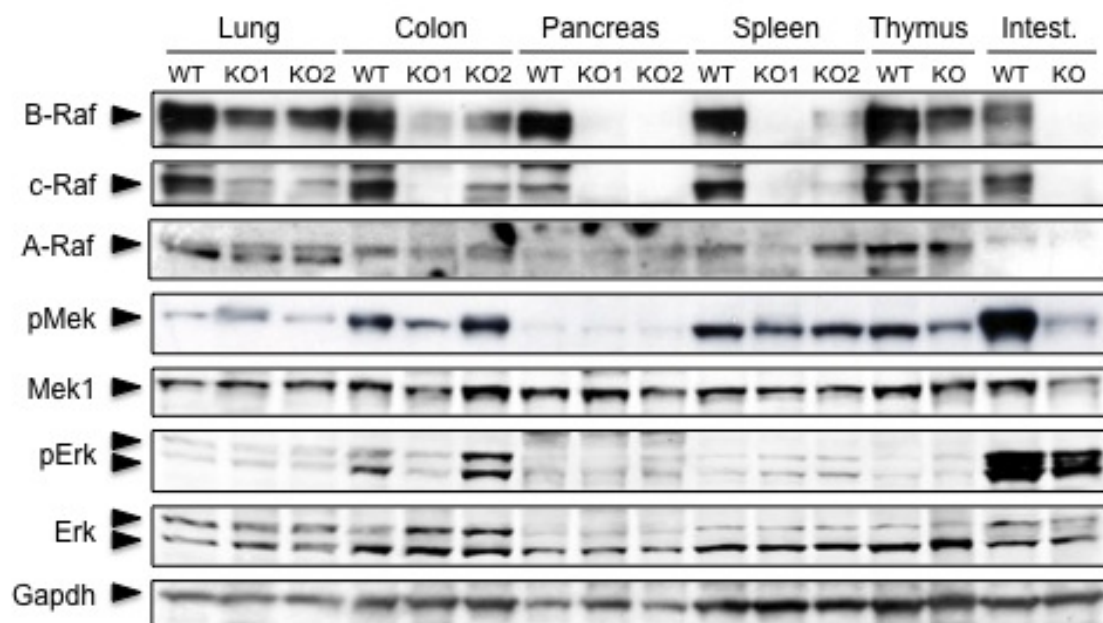


Figure S6. Related to Figure 6. Expression of the Mek and Erk proteins in B-Raf/c-Raf partially ablated adult tissues.

Western blot analysis of B-Raf, c-Raf, A-Raf, pMek, Mek1, pErk1/2 and Erk1/2 expression in lysates derived from tissues isolated from *B-Raf*^{+/+}; *c-Raf*^{+/+}; *RERT*^{ert/ert} (WT lanes) and *B-Raf*^{lox/lox}; *c-Raf*^{lox/lox}; *RERT*^{ert/ert} mice (KO lanes) fed *ad libitum* with a tamoxifen diet for three months (P30 to P120). Gapdh was used as loading control. Migration of the corresponding proteins is indicated by arrowheads.

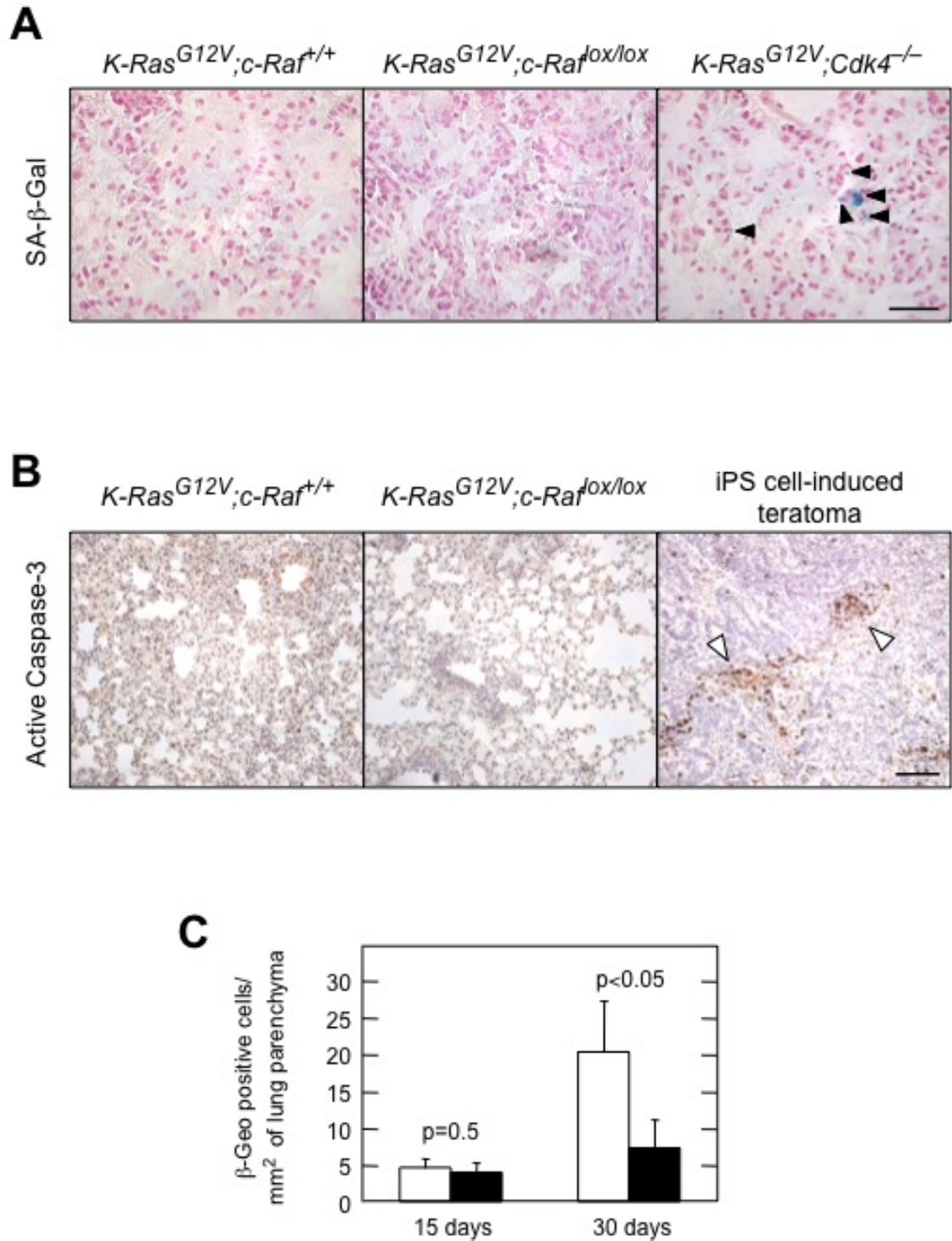


Figure S7. Related to Figure 7. Loss of c-Raf in $K-Ras^{G12V}$ -expressing lung cells does not induce senescence or apoptosis.

(A) SA-β-Gal staining of lung sections obtained from (left) $K-Ras^{+/G12V};c-Raf^{+/+}$ and (center) $K-Ras^{+/G12V};c-Raf^{lox/lox}$ mice four weeks after Ad-Cre treatment. (Right) SA-β-Gal staining of a lung section obtained from $K-Ras^{+/G12V};RERT^{ert/ert};Cdk4^{-/-}$ mice four

weeks after exposure to 4OHT was used as positive control.

Scale bar 50 μ m.

(B) Active Caspase 3 staining of lung sections obtained from **(left)** $K-Ras^{+/G12V};c-Raf^{+/+}$ and **(center)** $K-Ras^{+/G12V};c-Raf^{lox/lox}$ mice four weeks after Ad-Cre treatment. **(Right)** Active Caspase 3 staining of a section obtained from a teratoma induced by injecting iPS mouse cells in irradiated nude mice was used as positive control.

Scale bar 100 μ m.

(C) Quantification of $K-Ras^{G12V}$ expressing cells by X-Gal staining (based on the expression of the surrogate β -Geo marker) on lung cryosections, of (open bars) $K-Ras^{+/G12V};RERT^{ert/ert};c-Raf^{+/+}$ (n=3) and (solid bars) $K-Ras^{+/G12V};RERT^{ert/ert};c-Raf^{lox/lox}$ (n=3) mice. Animals were injected once intraperitoneally with 4OHT (2 mg) at 8-10 weeks of age. Samples were collected 15 days and 30 days after 4OHT treatment.

Error bars indicate +/- SD of the mean.

p values were calculated according to Student's t test

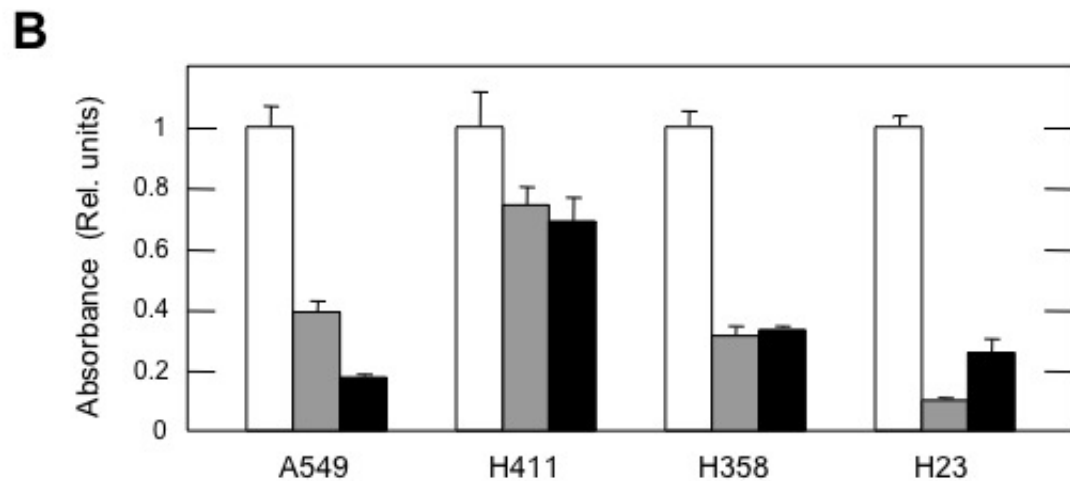
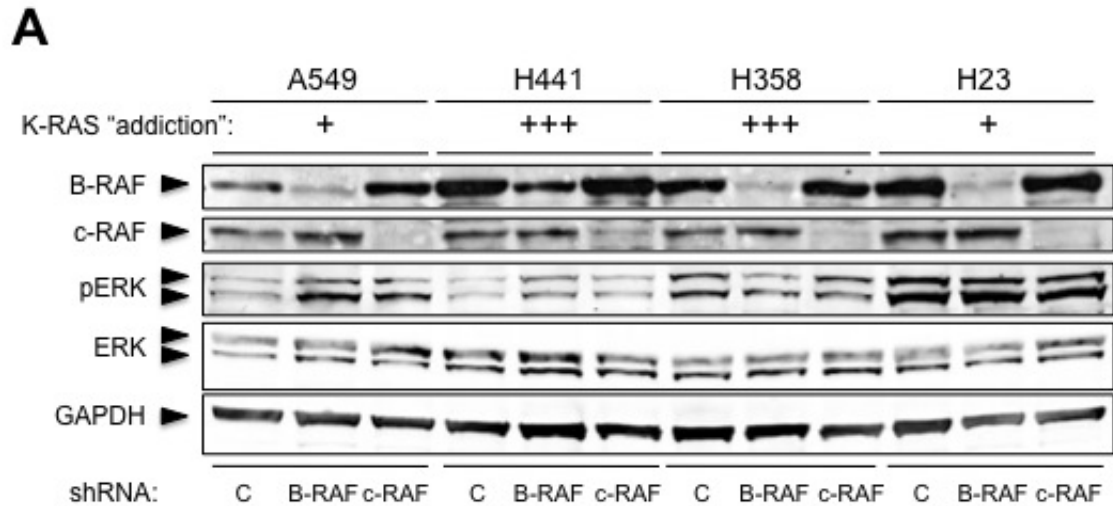


Figure S8. Related to Figure 8. Effect of B-RAF and c-RAF knock down on the proliferation of human NSCLC cell lines with different “addiction” levels to K-RAS oncogenes.

(A) Western blot analysis of B-RAF, c-RAF, pERK and ERK expression in human NSCLC cell lines carrying K-RAS oncogenes and infected with lentiviral vectors carrying control shRNAs (C) or shRNAs specific for *B-RAF* and *c-RAF* sequences. K-RAS “addiction” according to Singh et al., (2009) is indicated for each cell line.

GAPDH was used as loading control. Migration of the corresponding proteins is indicated by arrowheads.

(B) Relative proliferation rates of the indicated human NSCLC cell lines infected with lentiviral vectors carrying control shRNA (open bars) or shRNAs specific for B-*RAF* (grey bars) or c-*RAF* (solid bars) sequences and allowed to proliferate for 6 days. Data shown represent mean \pm SD, n=4.